

UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**ESTUDO DA PROTEÍNA HUMANA CENTROSSOMAL
TBCCD1: DETERMINAÇÃO DE DOMÍNIOS
FUNCIONAIS**

Inês Domingos Feio Pereira

Mestrado em Bioquímica

Área de Especialização em Bioquímica

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**ESTUDO DA PROTEÍNA HUMANA CENTROSSOMAL
TBCCD1: DETERMINAÇÃO DE DOMÍNIOS
FUNCIONAIS**

Inês Domingos Feio Pereira

Dissertação Orientada Pela Doutora Helena Soares
(Orientador FCUL Doutor Fernando Antunes)

Mestrado em Bioquímica

Área de Especialização em Bioquímica

2011

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de abreviaturas e símbolos	viii
I – Introdução	1
I.1 O Citoesqueleto: Microtúbulos	1
I.1.1 Nucleação dos Microtúbulos.....	3
I.2 O Centrossoma de células animais.....	5
I.2.1 Estrutura e função do centrossoma	5
I.2.2 Ciclo de duplicação dos centrossomas	8
I.2.3 Cílios e flagelos	10
I.3 Via de <i>foldin</i> g da tubulina.....	11
I.3.1 Cofactores da tubulina.....	13
I.3.1.1 Cofactor A (TBCA)	14
I.3.1.2 Cofactor B (TBCB).....	15
I.3.1.3 Cofactor C (TBCC).....	16
I.3.1.4 Cofactor D (TBCD)	18
I.3.1.5 Cofactor E (TBCE)	20
I.4 Família de proteínas relacionadas com os cofactores da tubulina	21
I.4.1 Proteína <i>E-like</i>	21
I.4.2 Família de proteínas que contém o domínio TBCC: TBCC, RP2 e TBCCD1.....	22
I.4.2.1 <i>Retinitis pigmentosa protein 2</i> (RP2)	23
I.4.2.2 <i>TBCC-domain containing protein 1</i> (TBCCD1).....	26
II – Objectivos	31
III – Materiais e Métodos	33
III.1 Reagentes	33
III.2 Equipamento.....	34
III.3 Linhas celulares	34
III.3.1 Condições de cultura celular	35
III.3.2 Contagem de células.....	35
III.4 Estirpes bacterianas e condições de cultura.....	36

III.4.1	Preparação de células de <i>E. coli</i> competentes	36
III.5	Clonagem de fragmentos de DNA em vectores de expressão.....	37
III.5.1	Amplificação de sequências DNA por PCR	37
III.5.2	Análise de DNA por electroforese em gel de agarose	37
III.5.3	Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição	38
III.5.4	Ligação do fragmento de DNA ao vector de expressão	38
III.5.5	Transformação de células competentes	38
III.5.6	Protocolo de <i>Cracking</i>	39
III.5.7	Produção de DNA plasmídico em pequena escala	39
III.5.8	Sequenciação automática de DNA	40
III.5.9	Produção de DNA plasmídico em grande escala	40
III.6	Mutagénesse dirigida.....	41
III.6.1	<i>Overlap extension PCR</i>	42
III.7	Clonagem de sequências codificantes da proteína TBCCD1 com deleções no N-terminal em vectores de expressão em células de mamíferos	44
III.8	Clonagem da sequência codificante dos 20 primeiros aminoácidos do N-terminal da proteína TBCCD1 em vectores de expressão em células de mamíferos	45
III.9	Clonagem da sequência codificante da proteína TBCCD1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> em vectores de expressão em células de mamíferos	46
III.10	Clonagem da sequência codificante da proteína TBCCD1 com os domínios CARP e TBCC deletados em vectores de expressão em células de mamíferos	46
III.11	Optimização da transfecção de células de mamífero com DNA plasmídico.....	47
III.12	Microscopia de Imunofluorescência	51
III.13	Análise estatística	52
IV	– Resultados.....	53
IV.1	Estudo dos domínios da proteína TBCCD1 humana na sua localização celular.....	53
IV.1.1	Análise da sequência de resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 humana	53
IV.1.2	Determinação do domínio mínimo crítico para a localização centrossomal da proteína TBCCD1 humana	56
IV.1.3	Análise da localização do domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 humana	60
IV.1.4	Comparação da sequência de resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 de diferentes espécies	62
IV.1.5	Estudo da localização da proteína TBCCD1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> em células humanas	65

IV.1.6 Estudo da importância dos domínios funcionais CARP e TBCC na proteína TBCCD1 humana.....	67
IV.2 Estudo de mutações pontuais no gene que codifica o TBCCD1	72
IV.2.1 Introdução de mutações pontuais na proteína TBCCD1 – critérios de escolha.....	73
IV.2.2 Construção de formas da proteína TBCCD1 humana com mutações pontuais	78
IV.2.3 Caracterização por imunofluorescência nas células humanas HEK 293T e HeLa da expressão de formas da proteína TBCCD1 humana com mutações pontuais.....	80
IV.3 Estudo do papel da proteína TBCCD1 humana na ciliogénese	93
IV.3.1 Impacto na ciliogénese das mutações P24A, K292E e K295E na proteína TBCCD1 humana.....	94
V – Discussão de Resultados.....	99
V.1 Estudo da região N-terminal da proteína TBCCD1 humana	99
V.2 Comparação das sequências de resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 de diferentes espécies	101
V.3 Estudo dos domínios funcionais CARP e TBCC na proteína TBCCD1 humana	102
V.4 Estudo das mutações pontuais na proteína TBCCD1 humana	104
V.5 Estudo do papel da proteína TBCCD1 humana na ciliogénese.....	109
VI – Conclusões e Perspectivas	115
VII – Referências.....	119
VIII – Anexos	127
VIII.1 Mapas dos vectores de expressão	127
VIII.1.1 pIC111 (6xHis-PreScission-GFP) – vector construído no vector pcDNA3.1+ - vector de expressão em mamífero.	127
VIII.2 Organismos analisados no alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos da região N-terminal do TBCCD1.....	128

Agradecimentos

Ao chegar ao final desta etapa da minha vida gostaria de deixar aqui um agradecimento sincero a todos aqueles que me ajudaram de algum modo a concretizar o projecto que aqui apresento:

À minha orientadora, Professora Doutora Helena Soares, por me ter aceite no seu grupo de investigação de modo a poder desenvolver este projecto. Muito obrigada por toda a disponibilidade, apoio, amizade e pela confiança demonstrada no meu trabalho. Agradeço também pela transmissão de conhecimentos e experiência científica, que me ajudaram a crescer a nível pessoal e científico.

Ao Professor Doutor Fernando Antunes por ter aceite ser meu orientador interno e pelo seu apoio e ajuda prestada no desenvolvimento do trabalho.

Aos restantes Professores do grupo, Doutora Luísa Cyrne, Doutora Susana Marinho e Doutora Carla Real, pelas discussões, auxílio e palavras de apoio.

Aos colegas do grupo de Bioquímica dos Oxidantes e Antioxidantes, CQB, FC, UL, Sara Carvalho, Alexandra Tavares, João Gonçalves, Ruben Ramalho, Daniela Grácio, Rita Tenente, Gonçalo Rodrigues, Gonçalo Covas, Verónica Brito, Juan Rodrigues, Ana Judite Duarte e Joana Pinto, pelo bom ambiente de trabalho no laboratório, pela ajuda na bancada, pelas brincadeiras e por terem tornado este ano especial. Um agradecimento especial à Alexandra Tavares por todos os ensinamentos, pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus pais por todo apoio incondicional e incentivo ao longo destes anos e por acreditarem sempre nas minhas capacidades. Obrigada pela formação e valores transmitidos que me ajudaram a traçar o meu caminho.

Ao meu irmão Pedro, que embora longe, sei que me apoia e que tem orgulho no que sou.

Um agradecimento muito especial ao João, pela sua infindável paciência para mim e para as minhas neuras e por compreender a dedicação necessária a este trabalho, principalmente na etapa final. Muito obrigada pela força, conselhos, incentivo e principalmente pelo amor e carinho!

Não posso deixar de agradecer à Ália, uma amiga para a vida, que desde sempre me incentivou e acreditou nas minhas capacidades. Obrigada pela força, amizade e por mesmo longe estares sempre presente!

Aos grandes amigos Marta Magalhães e Gustavo Sousa pelos grandes momentos de distração e divertimento.

Sei que nunca teria conseguido chegar aqui sem a ajuda da minha família e amigos, que fizeram de mim a pessoa que sou hoje e assim agradeço a todos por continuarem a influenciar a minha vida!

Resumo

O centróssoma é o principal centro organizador de microtúbulos das células animais, desempenhando funções celulares essenciais no processo de divisão celular, uma vez que regula a nucleação e organização espacial dos microtúbulos, estando também implicado no posicionamento de organelos na célula, como o complexo de Golgi, no estabelecimento da polaridade celular, na migração e adesão celulares e na ciliogénese. Nas células animais o centróssoma encontra-se posicionado no centro da célula em estreita associação com o núcleo. Os cofactores da tubulina (TBCE-E) são proteínas que participam na via de *folding* da tubulina e possuem funções relacionadas com o citoesqueleto, desempenhando papéis essenciais nas células eucariotas. A proteína TBCCD1 (*TBCC-domain containing protein 1*) é uma proteína centróssomal relacionada com o TBCC e com a proteína RP2, uma vez que possui os domínios funcionais TBCC e CARP, porém não parece possuir actividade de GAP para a tubulina. O TBCCD1 é um potencial regulador do posicionamento do centróssoma em estreita interacção com o núcleo e da organização citoplasmática.

Neste trabalho descrevemos a identificação do domínio responsável pela localização centróssomal da proteína TBCCD1 humana, constituído pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da sua região N-terminal. Em células humanas observámos que a expressão da proteína TBCCD1 com uma mutação pontual no resíduo de prolina na posição 24 leva à deslocalização da γ -tubulina do centróssoma. Verificámos também que três mutações pontuais distintas nos motivos VxPX e KRAK da proteína causam uma menor eficiência na formação de cílios primários.

Concluindo, a proteína centróssomal TBCCD1 humana parece ter uma ligação à γ -tubulina, contudo ainda não está esclarecido se esta interacção é directa ou indirecta, podendo a γ -tubulina ser um parceiro molecular do TBCCD1. O TBCCD1 deverá também ter um papel essencial *in vivo* resultante do seu envolvimento na manutenção da ligação do centróssoma ao núcleo e no processo de ciliogénese.

Palavras-chave: TBCCD1, centróssoma, γ -tubulina, cílios

Abstract

The centrosome is the major microtubule organizing center in animal cells, playing an essential role in cellular processes such as cell division, since it regulates the nucleation and spatial organization of microtubules, and is also implicated in organelle positioning in the cell, such as the Golgi apparatus, cell polarity establishment, cell migration and adhesion and ciliogenesis. In animal cells, the centrosome is positioned in the center of the cell in close association with the nucleus. The tubulin cofactors (TBCA-E) are proteins involved in tubulin folding pathway that have emerged as proteins with crucial roles in eukaryotic cells related to the cytoskeleton. The TBCCD1 protein (TBCC domain-containing protein 1) is a centrosomal protein related to TBCC and RP2 protein, since it contains the TBCC and CARP domains. However, TBCCD1 probably doesn't have a GAP activity towards tubulin. The TBCCD1 is a potential regulator of the positioning of the centrosome and cytoplasmic organization.

In this work we described the identification of the centrosome targeting motif of the human TBCCD1, corresponding to the first 20 amino acid residues of its N-terminus region. Our studies performed in mammalian cell lines revealed that the expression of TBCCD1 with a point mutation in the proline residue at position 24 leads to the mis-localization of γ -tubulin from the centrosome. Furthermore, we also found that three distinct point mutations in the motifs VxPX and KRAK lead to a lower efficiency of transfected cells to assemble primary cilia.

Also, the obtained results clearly show that the human centrosomal TBCCD1 protein seems to have an interaction with γ -tubulin, but whether this is direct or indirect is still not clear. However, our results support the idea that γ -tubulin will probably be a molecular partner of TBCCD1. The TBCCD1 should also have an essential role in vivo resulting from their involvement in maintaining the nucleus-centrosome association and its involvement in ciliogenesis.

Keywords: TBCCD1, centrosome, γ -tubulin, cilia

Lista de abreviaturas e símbolos

ADP – 5'-difosfato de adenosina

Arl2 - *ADP ribosylation factor-like protein 2*

Arl3 - *ADP ribosylation factor-like protein 3*

ARM – domínio Armadillo

ATP - 5'-trifosfato de adenosina

ATPase – enzima que catalisa a hidrólise do ATP

BSA – albumina do soro de bovino

CAP - *cyclase-associated proteins*

CARP – *domain in CAPs*

CCT – *cytosolic-chaperonin-containing TCP1*

C-Coil – domínio *coiled-coil*

C-terminal – extremidade de uma cadeia polipeptídica cujo último resíduo de aminoácido apresenta um grupo carboxilo

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindole

DMEM – meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle*

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – 5'-trifosfato de desoxinucleótido

EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético

FBS – soro fetal bovino

GAP – *GTPase activating protein*

GCPs - *γ-tubulin complex proteins*

GCP-WD - *γ-tubulin complex proteins-WD40 domain*

GDP – 5'-difosfato de guanina

GFP – proteína fluorescente verde

GTP – 5'-trifosfato de guanina

IFT – transporte intraflagelar

LB – meio Luria Bertani ou *Lysogeny Broth*

LRR – domínio *leucine-rich repeats*

MAPs – proteínas associadas a microtúbulos

MTOCs – centros organizadores de microtúbulos

mRNA – RNA mensageiro

NDPk – *nucleoside diphosphate kinase*

NDK1 – *nucleoside diphosphate kinase 1*

N-terminal - extremidade de uma cadeia polipeptídica cujo primeiro resíduo de aminoácido apresenta um grupo amina livre

Pak1 – *p21-activated kinase 1*

PBS – solução tampão fosfato-salino

PCM – material pericentriolar

PCR – *polymerase chain reaction*

PLK4 – *polo-like kinase 4*

PP2A – *protein phosphatase 2A*

RNA – ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RP2 – *Retinitis pigmentosa protein 2*

RT-PCR – *reverse transcription polymerase chain reaction*

SAS6 – *spindle assembly abnormal 6*

SDS – dodecil sulfato de sódio

siRNA – pequeno RNA interferente (de *short interfering RNA*)

TBCA – cofactor da tubulina A (de *tubulin cofactor A*)

TBCB – cofactor da tubulina B (de *tubulin cofactor B*)

TBCC – cofactor da tubulina C (de *tubulin cofactor C*)

TBCCD1 – *TBCC-domain containing protein 1*

TBCD – cofactor da tubulina D (de *tubulin cofactor D*)

TBCE – cofactor da tubulina E (de *tubulin cofactor E*)

Triton X-100 – iso-octifenoxipolietoxietanol

Tween 20 – polioxietileno(sorbitan)monolaurato

UBL – domínio *ubiquitin-like*

γ -TuRC - *γ -tubulin ring complex*

γ -TuSC - *γ -tubulin small complex*

I – Introdução

I.1 O Citoesqueleto: Microtúbulos

O citoesqueleto de células eucariotas é uma rede dinâmica filamentosa composta por três diferentes tipos de fibras: filamentos de actina (F-actina; 5-7 nm), filamentos intermédios (10 nm) e microtúbulos (25 nm). Os filamentos intermédios são constituídos por proteínas filamentosas, enquanto que os filamentos de actina e os microtúbulos são constituídos por monómeros de proteínas globulares, a actina e a tubulina, respectivamente. Os três componentes do citoesqueleto comunicam entre si de forma a regular a organização do citoplasma e a forma da célula (Fletcher & Mullins, 2010).

A rede de microtúbulos está envolvida em diversos processos celulares essenciais, tais como o transporte intracelular de proteínas e organelos, a organização espacial intracelular e a manutenção da forma, a polaridade celular, a formação do fuso bipolar na mitose/meiose e a mobilidade celular (Conde & Cáceres, 2009; Lüders & Stearns, 2007). Todas estas funções envolvem a interacção dos microtúbulos com um grande número de MAPs (proteínas associadas aos microtúbulos), que são importantes na regulação da dinâmica, distribuição e arranjo dos microtúbulos na célula (Nogales, 2001). Os microtúbulos fazem ainda parte de estruturas celulares especializadas, como os centríolos e corpos basais.

Os microtúbulos são polímeros polares formados por heterodímeros de α - e β -tubulina, que constituem a subunidade funcional e estrutural destas estruturas (Lüders & Stearns, 2007). Para originar o microtúbulo, os heterodímeros de tubulina associam-se topo a topo por ligações não covalentes formando protofilamentos lineares, que por sua vez se associam paralelamente originando um tubo oco. Cada microtúbulo é geralmente constituído por cerca de 13 protofilamentos. A polaridade dos microtúbulos reflecte a forma como as subunidades se associam nos protofilamentos, uma vez que uma das extremidades do microtúbulo apresenta expostas apenas subunidades de β -tubulina, enquanto a outra apresenta apenas subunidades de α -tubulina. As duas extremidades dos microtúbulos requerem para polimerizar concentrações críticas de heterodímeros de tubulina distintas. A concentração crítica de cada extremidade do microtúbulo corresponde à concentração de tubulina acima da qual a extremidade polimeriza e abaixo da qual despolimeriza. Por consequência as duas

extremidades dos microtúbulos possuem taxas de polimerização diferentes, onde a extremidade que tem exposta β -tubulina corresponde à que possui uma menor concentração crítica de tubulina e uma maior e mais rápida polimerização. A extremidade que tem exposta α -tubulina é a que tem uma menor taxa de polimerização. As duas extremidades são designadas por “+” e “-”, respectivamente (Amos & Schlieper, 2005; Conde & Cáceres, 2009; Desai & Mitchison, 1997).

Os microtúbulos são estruturas altamente dinâmicas que podem alternar, de forma estocástica, entre as fases de crescimento (polimerização) e encurtamento (despolimerização), comportamento denominado por instabilidade dinâmica e que se baseia na ligação e hidrólise do GTP pela tubulina (Nogales, 2001). Ambos os monómeros α - e β -tubulina possuem um local de ligação ao GTP, mas apenas a β -tubulina apresenta actividade de GTPase, sendo capaz de o hidrolisar em GDP e posteriormente permutar por GTP (Amos & Schlieper, 2005). Assim, durante a polimerização, o GTP ligado à β -tubulina é hidrolisado, resultando em GDP. Deste modo, enquanto a adição de heterodímeros-GTP for maior e mais rápida que a hidrólise do GTP, o microtúbulo manterá um *CAP* de tubulina-GTP na extremidade “+” que o estabiliza, dando-se a polimerização. Quando esta *CAP* é estocasticamente perdida devido há hidrólise dos GTP pelos heterodímeros na extremidade “+”, há uma diminuição das interações nos heterodímeros dos protofilamentos adjacentes, levando à formação de protofilamentos curvados e à despolimerização do microtúbulo (Nogales, 2001).

In vivo, sempre que as duas extremidades dos microtúbulos se encontram livres, para além da instabilidade dinâmica, estes apresentam um comportamento designado por *treadmilling*. Este comportamento reside nas diferentes capacidades de polimerização das duas extremidades. Assim, se a velocidade de adição de subunidades na extremidade “+” for igual à velocidade de perda de subunidades na extremidade “-” não se observará qualquer alteração no comprimento dos microtúbulos. Caso contrário o microtúbulo tenderá a desaparecer, se ambas as extremidades tendem a perder heterodímeros, ou a crescer mais por uma extremidade enquanto a outra tende a diminuir. A existência de *treadmilling* está relacionada com as diferentes concentrações críticas de heterodímeros para polimerizar apresentada pelas duas extremidades (Nogales, 2001).

As propriedades dinâmicas dos microtúbulos dependem não só da capacidade intrínseca da tubulina para polimerizar, a qual está relacionada com o estado do nucleótido, mas podem também ser modificadas e reguladas por outros factores, como por exemplo: (i) a disponibilidade de diferentes isotipos de α - e β -tubulina por regulação diferencial da

transcrição de diferentes genes que codificam para a tubulina; (ii) o controlo da via de *foldin* da tubulina; (iii) a existência de modificações pós-traducionais na tubulina; (iv) o funcionamento e regulação dos centros organizadores de microtúbulos onde ocorre a nucleação de microtúbulos; (v) interação dos microtúbulos com MAPs e proteínas motoras (Nogales, 2001).

I.1.1 Nucleação dos Microtúbulos

A baixas concentrações de tubulina, a polimerização de novos microtúbulos é um processo cineticamente limitante. De forma a ultrapassar esta barreira a nucleação de microtúbulos *in vivo* ocorre em estruturas especializadas, designadas centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) (Wiese & Zheng, 2006). O principal MTOC das células animais é o centrossoma, enquanto nas leveduras são os corpos polares do fuso (*spindle pole bodie*). No entanto, existem outros organelos capazes de nuclear os microtúbulos, como o complexo de Golgi (Chabin-Brion et al., 2001), corpos basais ou o corpo médio (Lüders & Stearns, 2007; Wiese & Zheng, 2006).

Para iniciar a formação dos microtúbulos é necessário que heterodímeros de α - e β -tubulina se associem de modo a criar uma base, onde a sua extremidade “-“ está ligada ao MTOC (Pereira & Schiebel, 1997) e a partir da qual os microtúbulos podem alongar rapidamente. Existem proteínas na célula que regulam a formação dos microtúbulos, facilitando a sua nucleação imitando esta base ou estabilizando-a (Wiese & Zheng, 2006). A nucleação dos microtúbulos ocorre primariamente nos MTOCs, mais especificamente num complexo multiproteico em forma de anel, o *γ -tubulin ring complex* (γ -TuRC). O γ -TuRC é uma estrutura altamente conservada composta por γ -tubulina e proteínas associadas (Zheng et al., 1995) que permite criar a base para que a polimerização dos heterodímeros de α - e β -tubulina ocorra (Heald & Nogales, 2002).

A γ -tubulina é uma proteína que se verificou ser essencial na nucleação dos microtúbulos. Foi identificada pela primeira vez em *Aspergillus nidulans* (Oakley & Oakley, 1989). Neste mesmo estudo foi demonstrado que é indispensável na formação dos microtúbulos nos corpos polares do fuso da levedura. É uma proteína ubíqua e conservada filogeneticamente, pertencendo à superfamília das tubulinas e com elevada homologia com as α - e β -tubulina, mas que não incorpora os protofilamentos que formam a parede dos microtúbulos, ligando-se à

extremidade “-” dos mesmos. Esta proteína localiza-se na matriz pericentriolar (PCM), nos centríolos do centrossoma (Fuller et al., 1995) e no citoplasma (Wiese & Zheng, 2006).

Na célula, a γ -tubulina está associada a várias proteínas altamente conservadas, designadas por GCPs (*γ -tubulin complex proteins*), formando assim o γ -TuRC, como referido anteriormente. As GCPs são numeradas por ordem crescente de massa molecular, sendo a γ -tubulina a GCP1. A γ -tubulina pode também associar-se em complexos mais pequenos, os γ -TuSCs (*γ -tubulin small complexes*). O complexo γ -TuSC é composto pela γ -tubulina e por mais duas proteínas, as GCP2 e 3, enquanto o γ -TuRC para além destas proteínas possui também as GCP4, 5 e 6 e a GCP-WD (ou NEDD1) (figura I.1.A). As proteínas GCP 2-6 são requeridas para a associação do complexo γ -TuRC e para a progressão eficiente da mitose, enquanto a GCP-WD regula a função e o recrutamento do γ -TuRC para o centrossoma e ao longo do fuso e microtúbulos (Bouissou et al., 2009).

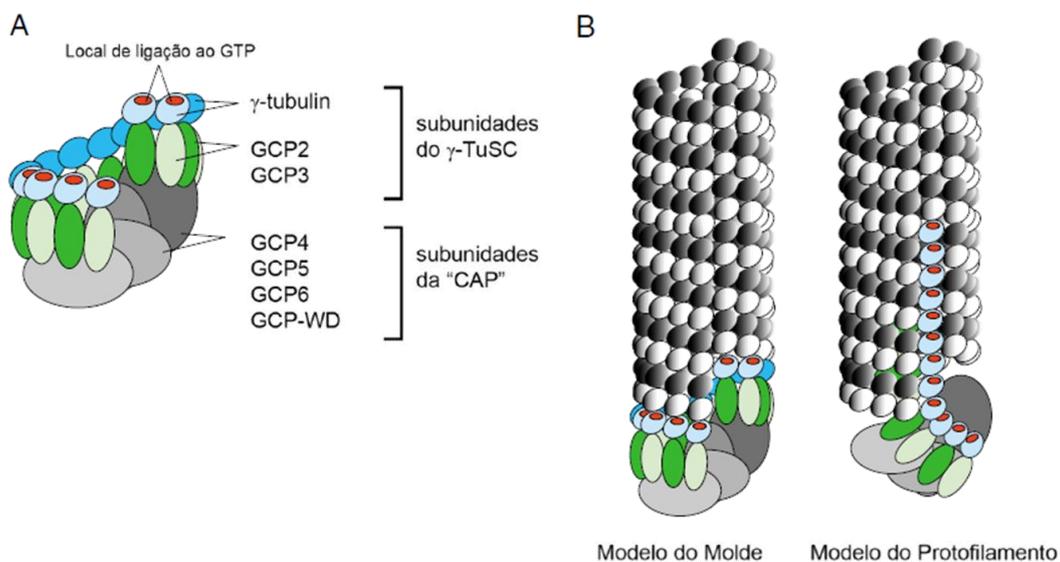


Figura I.1. Modelos propostos para a nucleação de microtúbulos a partir do complexo γ -TuRC. (A) Complexo γ -TuRC. Modelo proposto da organização das proteínas no complexo γ -TuRC, unidade funcional da nucleação dos microtúbulos. Neste modelo as proteínas GCP 4-6 e GCP-WD formam a *cap* que liga o subcomplexo γ -TuSC, mantendo o complexo γ -TuRC unido **(B) Modelos de nucleação dos microtúbulos.** No **modelo do molde** a γ -tubulina associa-se lateralmente formando um anel que constitui a primeira volta da hélice do microtúbulo em crescimento, funcionando o γ -TuRC como molde para a nucleação. O **modelo do protofilamento** propõe um arranjo perpendicular das subunidades de γ -tubulina no γ -TuRC, formando um protofilamento, que seria prolongado pela adição de heterodímeros de α - e β -tubulina. Adaptado de Wiese & Zheng, 2006.

Atualmente, existem dois modelos propostos para explicar de que forma o γ -TuRC está envolvido na nucleação dos microtúbulos: o modelo do molde e o modelo do protofilamento, ver figura I.1.B.

O **modelo do molde** postula que as subunidades de γ -tubulina adjacentes interagem lateralmente umas com as outras formando um complexo em anel que constitui a primeira volta da hélice do microtúbulo em crescimento, funcionando o γ -TuRC como molde para a associação longitudinal dos heterodímeros de α - e β -tubulina. No **modelo do protofilamento** é proposto um arranjo perpendicular das subunidades de γ -tubulina no γ -TuRC, através de interações topo a topo, formando uma espécie de protofilamento. Este protofilamento seria prolongado pela adição de heterodímeros de α - e β -tubulina, que se associariam lateralmente (Wiese & Zheng, 2006). A obtenção da estrutura da γ -tubulina revelou que esta tem tendência a formar associações laterais no complexo γ -TuRC, favorecendo o modelo do molde (Aldaz et al., 2005). Contudo, não existem ainda evidências experimentais definitivas para esclarecer qual o modelo que corresponde à realidade.

O complexo γ -TuRC está envolvido, para além da nucleação, na regulação da dinâmica dos microtúbulos, limitando os eventos de despolimerização, e consequentemente aumentando a estabilidade dos microtúbulos (Bouissou et al., 2009).

I.2 O Centrossoma de células animais

O centrossoma é o principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) das células animais, desempenhando uma função essencial no processo de divisão celular (Chae et al., 2005), uma vez que regula a nucleação e organização espacial dos microtúbulos. Esta estrutura foi descrita pela primeira vez por Theodor Boveri em 1888 (Bettencourt-Dias & Glover, 2007).

I.2.1 Estrutura e função do centrossoma

O centrossoma de células animais é composto por um par de centríolos, o centríolo-mãe e o centríolo-filho, orientados ortogonalmente, ligados por fibras conectoras nas extremidades

proximais e rodeados por uma matriz proteica densa denominada material pericentriolar (PCM) (figura 1.2.) (Bettencourt-Dias & Glover, 2007).

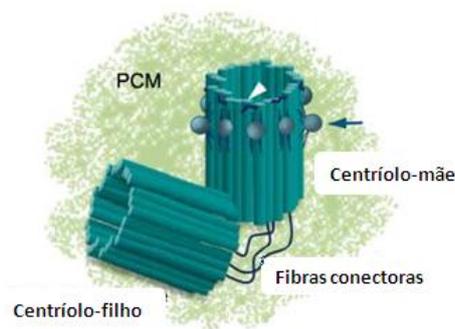


Figura 1.2. O centrossoma de células animais. Representação esquemática do centrossoma de células animais, constituído por dois centríolos, ligados por fibras conectoras e rodeados por material pericentriolar (PCM). O centríolo-mãe apresenta apêndices distais (seta azul) e sub-distais (ponta da seta branca). Adaptado de Gonçalves et al., 2010b.

Os centríolos são estruturas cilíndricas em forma de barril (*barrel-shaped*) constituídas por nove tripletos de microtúbulos, organizados numa configuração simétrica radial e encontram-se polarizados ao longo do seu eixo proximal-distal. Por sua vez, cada tripleto é constituído por um microtúbulo completo e dois incompletos (Doxsey, 2001). Estas estruturas são extremamente estáveis, uma vez que os seus microtúbulos são resistentes a agentes despolimerizantes como o frio ou detergentes. Esta estabilidade pode ser devida a modificações pós-traducionais da tubulina centriolar, como a poliglutamilação, ou a proteínas que sejam componentes estruturais dos centríolos (Bettencourt-Dias & Glover, 2007).

Devido à duplicação dos centríolos no ciclo celular, cada par é composto por um centríolo-mãe, mais velho, e um centríolo-filho, mais novo. Os dois centríolos são morfologicamente diferentes, uma vez que o centríolo-mãe possui apêndices sub-distais e distais que ligam os microtúbulos ao centrossoma e ancoram os centríolos à membrana plasmática, respectivamente. Ao ancorar-se à membrana plasmática o centríolo-mãe passa a designar-se por corpo basal (Kobayashi & Dynlacht, 2011) e pode nuclear o axonema ciliar. Na passagem de centríolo-mãe para corpo basal ocorrem alterações estruturais, como a aquisição de apêndices adicionais, e de outras propriedades, que serão importantes para a formação e organização dos cílios ou flagelos (Debec et al., 2010).

A função dos centríolos muda em função do ciclo celular, uma vez que promovem a formação dos fusos polares na mitose, actuam como corpos basais na formação de cílios primários em G0 (Kobayashi & Dynlacht, 2011). No entanto, quando os centríolos são removidos ou destruídos de células animais, estas continuam a formar o fuso mitótico (Lüders & Stearns, 2007), mas não conseguem completar a citocinese e ocorre a dispersão do PCM (Bettencourt-Dias & Glover, 2007).

O PCM que rodeia os centríolos é uma matriz electrodensa constituída por proteínas. Embora a organização molecular desta estrutura ainda não esteja totalmente clarificada, estudos recentes de proteómica identificaram várias proteínas distintas que integram o centrossoma (Andersen et al., 2003). Assim, estão descritas quatro classes diferentes de proteínas centrossomais (Lange, 2002): as proteínas que mantêm a estrutura do centrossoma e que são responsáveis por sustentar a associação de outras proteínas centrossomais; as proteínas que estão envolvidas na nucleação dos microtúbulos, como a γ -tubulina; as proteínas de ancoragem que formam um interface entre as proteínas nucleadoras de microtúbulos e as moléculas de regulação, como a pericentrina ou a NEDD1; e os elementos reguladores, como as cinases, fosfatases ou moléculas de sinalização.

Dada a sua função nucleadora e organizadora de microtúbulos nas células animais, o centrossoma regula diversos processos como a mobilidade, adesão celular e transporte intracelular durante a interfase, e facilita a organização dos fusos mitóticos durante a mitose (Debec et al., 2010). O centrossoma é necessário para a manutenção da polaridade da célula, uma vez que tem papel crucial na manutenção da assimetria do citoesqueleto durante a migração celular (Wakida et al., 2010). Esta estrutura está também implicada na fase final da divisão celular, durante a citocinese, uma vez que o centríolo-mãe se movimenta até ao corpo médio, coincidindo com o momento da abscisão, evento requerido para a separação das duas células (Bettencourt-Dias & Glover, 2007).

O centrossoma, como o nome indica, é geralmente mantido no centro da célula, em estreita relação com o núcleo, sendo a sua posição crucial para a organização interna e funcionamento da célula (Bornens, 2008). O posicionamento do centrossoma requer uma rede de microtúbulos polarizada radialmente no citoplasma. Diversos tipos de forças são aplicadas no complexo centrossoma-microtúbulos, actuando separadamente ou em conjunto para manter a posição do centrossoma no centro de células em interfase (Burakov et al., 2003). Para além do jogo de forças que actua para posicionar o centrossoma na célula existem também proteínas com funções estruturais que promovem a ligação física do centrossoma ao núcleo, como as

proteínas SUN 1 e 2 do sistema KASH-SUN que se localizam no invólucro nuclear (Razafsky & Hodzic, 2009), ou que apenas regulam esta ligação, como o caso da proteína cinase p160ROCK (Chevrier et al., 2002). Este posicionamento do centróssoma em células em interfase define o posicionamento de certos organelos cuja localização na célula depende da rede de microtúbulos. Especificamente, o complexo de Golgi é posicionado normalmente no centro da célula junto ao núcleo e em associação com o centróssoma (Sütterlin & Colanzi, 2010).

I.2.2 Ciclo de duplicação dos centróssomas

O ciclo celular é uma sequência de eventos ordenada que leva à divisão de uma célula em duas, ficando cada uma com uma cópia idêntica do genoma. Em divisões normais, o DNA e o centróssoma são duplicados uma vez no decorrer de cada ciclo celular (Urbani & Stearns, 1999).

O ciclo de duplicação dos centróssomas ocorre em quatro etapas dependentes do ciclo celular (figura I.3.) (Sluder & Khodjakov, 2010). A primeira etapa do processo de duplicação dos centríolos ocorre na fase G1 e corresponde à desorientação centriolar, que leva à perda da configuração ortogonal dos centríolos pré-existentes (centríolo-mãe e filho originais). De seguida, na fase S, há a formação do procentríolo na extremidade proximal dos centríolos pré-existentes. Os procentríolos continuam a alongar até à fase G2, atingindo o seu comprimento final na mitose. Na fase G2 do ciclo celular os centríolos recrutam várias proteínas, dando-se a maturação dos dois centróssomas. Por fim, na entrada para a mitose, os novos centróssomas separam-se fisicamente, migrando cada um para pólos opostos do fuso. Os novos centróssomas são formados por um centríolo-mãe, mais antigo, e um centríolo-filho, recém-formado (Debec et al., 2010; Kobayashi & Dynlacht, 2011).

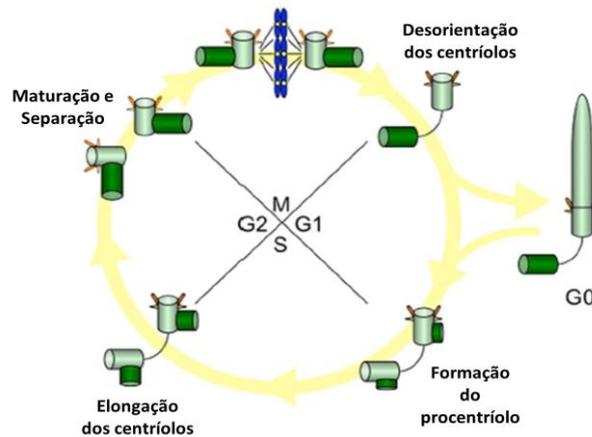


Figura 1.3. Ciclo de duplicação dos centrosomas. Representação esquemática das várias etapas do ciclo de duplicação dos centrosomas. O início do processo de duplicação ocorre na fase G1 com a separação dos centríolos pré-existentes, que deixam de ter uma orientação ortogonal. De seguida, na fase S do ciclo celular dá-se a duplicação dos centrosomas, através da formação dos procentríolos na extremidade proximal dos centríolos pré-existentes. Os procentríolos formados alongam até ao final da fase G2. Na passagem da fase G2 para a mitose (M) ocorre a maturação dos centrosomas, a qual envolve o recrutamento de várias proteínas. Depois da mitose o par de centrosomas separa-se. Na fase G0, o centríolo-mãe migra para a membrana plasmática de modo a tornar-se um corpo basal e formar o cílio primário. Adaptado de Kobayashi & Dynlacht, 2011.

A manutenção constante do número de centríolos requer dois tipos de controlo. O controlo efectuado pelo ciclo celular assegura que a duplicação dos centrosomas ocorra apenas uma vez por ciclo, enquanto o controlo do número de cópias assegura que apenas um novo centríolo é formado junto do centríolo pré-existente (Nigg & Raff, 2009). No entanto, estudos recentes identificaram um conjunto de proteínas que actuam neste processo. Por exemplo, as proteínas SAK/PLK4 e SAS6 são necessárias para a biogénese dos centríolos, uma vez que a sua sobreexpressão leva à formação de vários procentríolos. Por sua vez, a existência de vários procentríolos leva à formação de vários centríolos e a problemas na divisão celular e na formação de cílios primários (Bettencourt-Dias et al., 2005).

Diversos estudos sobre cancro reportam anomalias na estrutura e número do centrosoma, principalmente a amplificação do seu número por célula, dando origem a fusos mitóticos multipolares que levam à separação dos cromátídeos irmãos em diferentes direcções durante a mitose. Como consequência são formadas células multinucleadas e aneuploides,

características de várias células cancerígenas. Contudo, ainda não existem evidências genéticas directas que liguem o centrossoma à cancerigénese (Nigg & Raff, 2009).

I.2.3 Cílios e flagelos

Uma das principais funções dos centríolos é a conversão do centríolo-mãe em corpo basal nucleando o axonema dos cílios e flagelos. Cílios ou flagelos são projecções da superfície das células e desempenham funções celulares essenciais como a mobilidade da própria célula, a promoção do movimento de fluidos e a transdução de sinais, funcionando como antenas das células (Ishikawa & Marshall, 2011). Existem diferentes tipos de cílios dependendo da estrutura do axonema e estão presentes na maioria das células de vertebrados (Debec et al., 2010).

Os cílios são constituídos por uma estrutura especializada de microtúbulos, o axonema, revestida por uma membrana ciliar que é contígua à membrana plasmática. Os cílios estão classificados em duas grandes categorias: os cílios primários e motores. Os **cílios motores** estão, por exemplo, presentes em células epiteliais, nos gâmetas flagelados e nos organismos unicelulares ciliados e flagelados, onde se agitam cooperativamente para gerar o movimento de fluidos. Os **cílios primários**, podem ser encontrados na maioria das células humanas, normalmente isolados, são imóveis e são responsáveis pela percepção de sinais físicos e bioquímicos extracelulares (Ishikawa & Marshall, 2011).

Os cílios motores apresentam uma estrutura conservada (Plotnikova et al., 2009) em que o axonema é constituído por nove dupletos de microtúbulos a rodear um par de microtúbulos central (estrutura 9+2). Estes cílios possuem ainda proteínas ligadas aos microtúbulos, como braços de dineína (Ishikawa & Marshall, 2011), que conferem mobilidade à célula, como no caso dos espermatozóides, ou promovem o movimento de fluidos através do seu batimento, como acontece nas células epiteliais ciliadas. Os cílios primários têm um axonema composto apenas por 9 dupletos de microtúbulos organizados radialmente, não possuindo o par central (estrutura 9+0) e estão envolvidos em várias vias de sinalização essenciais para o crescimento e diferenciação, como a via do *hedgehog* (Kobayashi & Dynlacht, 2011).

O mecanismo de montagem dos cílios primários nas células animais corresponde a uma sequência de passos ordenada, que é iniciada pela formação do corpo basal através da

migração e ancoragem do centríolo-mãe à membrana plasmática, na fase G0 do ciclo celular. Durante esta conversão o corpo basal associa-se a vesículas e promove a nucleação do axonema do cílio em crescimento. A junção entre o corpo basal e o axonema é designada por zona de transição. A montagem dos dupletos exteriores ocorre exclusivamente na extremidade distal do cílio (Ishikawa & Marshall, 2011).

Como a síntese proteica está restrita ao citoplasma, não ocorrendo dentro do cílio, a alongação do mesmo requer a importação selectiva e o transporte de proteínas ciliares para a base do cílio por um processo designado transporte intraflagelar (IFT) (Ishikawa & Marshall, 2011).

O funcionamento correcto dos cílios motores e primários é extremamente importante, uma vez que a sua disfunção está associada a várias doenças humanas, designadas por ciliopatias e que apresentam fenótipos graves. Dentro das ciliopatias estão, entre outras, incluídas doenças como a cegueira, infertilidade masculina, doenças mentais, obesidade e a diabetes (Nigg & Raff, 2009).

I.3 Via de *fold*ing da tubulina

A via de *fold*ing da tubulina é o processo pelo qual o heterodímero de α - e β -tubulina adquire a sua estrutura tridimensional funcional, envolvendo a interacção das tubulinas com chaperones moleculares (Szolajaska & Chroboczek, 2011) e cofactores da tubulina (TBCA-E) (Gonçalves et al., 2010b) (figura I.4.).

A tubulina recém-sintetizada nos ribossomas interage com um complexo hetero-hexamérico, o chaperone prefoldina (PFD). A chaperonina citosólica CCT (*cytosolic chaperonin-containing TPC1*) captura a tubulina recém-sintetizada directamente do ribossoma ou a partir da prefoldina. O CCT é um complexo hetero-oligomérico formado por dois anéis sobrepostos, cada um composto por oito subunidades diferentes (CCT α -CCT ζ). De um modo dependente da hidrólise de ATP, o CCT assiste no *fold*ing das α - e β -tubulina, libertando-as numa conformação *quasi-nativa* (Tian et al., 1995). Depois da interacção com o CCT, as α - e β -tubulina seguem duas vias de *fold*ing diferentes: a α -tubulina é capturada pelo cofactor B (TBCB), enquanto a β -tubulina se liga ao cofactor A (TBCA). Seguidamente, os cofactores E (TBCE) e D (TBCD) capturam a α - e β -tubulina, respectivamente (Tian et al., 1996, 1997). As duas vias convergem

e dá-se a formação de um super-complexo constituído pela α -, β -tubulina, TBCE e TBCD. O cofactor C (TBCC) interage com este complexo e promove a hidrólise do GTP pela β -tubulina, libertando-se o heterodímero de α/β -tubulina-GDP (Tian et al., 1999). Por fim ocorre a troca de GDP por GTP e a formação de heterodímeros competentes para polimerizar os microtúbulos (figura I.4.A) (Gonçalves et al., 2010; Lopez-Fanarraga et al., 2001).

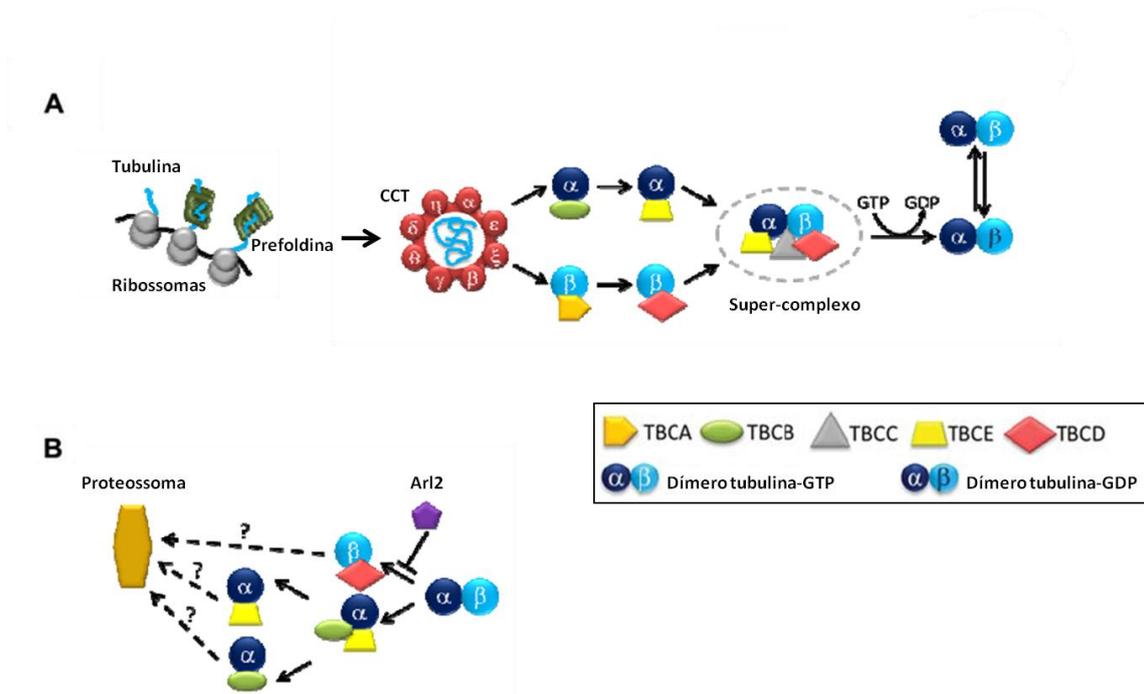


Figura I.4. Via de *folding* da tubulina. (A) Representação esquemática da via de *folding* da tubulina. A tubulina (α - e β -tubulina) recém-sintetizada no ribossoma interage com o complexo prefoldina (PFD), que a direcciona para a chaperonina citosólica CCT. Após o CTT assistir no seu *folding* a α - e β -tubulina seguem vias diferentes de *folding*: a α -tubulina interage com o TBCB e TBCE, enquanto a β -tubulina interage com o TBCA e TBCD. De seguida as vias convergem pela interacção com o TBCC, formando-se um supercomplexo α -tubulina/TBCE/ β -tubulina/TBCD/TBCC e promovendo a hidrólise do GTP da β -tubulina e a consequente libertação do heterodímero α - e β -tubulina. Por fim há a troca de GDP por GTP no local de ligação ao GTP da β -tubulina, ficando os heterodímero de α - e β -tubulina competentes para polimerizar microtúbulos (Gonçalves, Tavares, et al., 2010). **(B)** A via de *folding* da tubulina também ocorre no sentido inverso. Os heterodímero nativos de α - e β -tubulina provenientes da despolimerização dos microtúbulos podem ser dissociados em α -tubulina e β -tubulina pela interacção com o TBCE e TBCB ou pela interacção com o TBCD, respectivamente (Kortazar et al., 2007). A dissociação do heterodímero é regulada pela proteína Arl2 que forma um complexo com o TBCD, impedindo a ligação deste à β -tubulina (Bhamidipati, S. a Lewis, & Cowan, 2000). Este processo faz parte de um mecanismo de controlo de qualidade da tubulina, em que os monómeros de α - e β -tubulina são

reciclados pelo super-complexo ou degradados pelo proteossoma se estiverem danificados. Adaptado de Gonçalves et al., 2010b.

Pode também ocorrer a dissociação dos heterodímeros de tubulina nativa em α -tubulina e β -tubulina provenientes da despolimerização dos microtúbulos pela interacção com os cofactores (figura 1.4.B). A α -tubulina é capturada pelo TBCB e pelo TBCE, enquanto a β -tubulina pode ser recuperada para a via de *folding* pelo TBCA (Kortazar et al., 2007) ou capturada pelo TBCD. Assim os monómeros dissociados e ligados as cofactores podem ser reciclados através do super-complexo ou ser degradados pelo proteossoma, dependendo dos requisitos da célula. A função do TBCD na dissociação dos heterodímeros de tubulina é regulada pela sua interacção com a proteína Arl2 (ADP ribosylation factor-like protein 2). A Arl2 é uma GTPase que se liga ao TBCD prevenindo que este se ligue à β -tubulina, impedindo assim a dissociação do heterodímero de tubulina (Bhamidipati et al., 2000). Este modelo pode fazer parte de um mecanismo de regulação dos microtúbulos que permite a reciclagem ou a degradação das subunidades de tubulina existentes (Lopez-Fanarraga et al., 2001).

1.3.1 Cofactores da tubulina

Os cofactores da tubulina (TBCA-E) desempenham papéis essenciais nas células eucariotas, uma vez que participam na via de *folding* da tubulina e possuem funções relacionadas com o citoesqueleto de microtúbulos, actuando no controlo da concentração e qualidade das subunidades de tubulina e na estabilidade dos microtúbulos (Szolajska & Chroboczek, 2011). Assim, de uma forma geral, o facto de os cofactores da tubulina serem capazes de interagir e dissociar o heterodímero nativo de tubulina está relacionado com o controlo da qualidade e a reciclagem dos heterodímeros de tubulina (Lopez-Fanarraga et al., 2001). No entanto, as funções dos cofactores da tubulina são emergentes e ainda não são totalmente compreendidas na suas implicações *in vivo*.

I.3.1.1 Cofactor A (TBCA)



Figura I.5. TBCA. Representação esquemática da proteína TBCA humana. Adaptado de Gonçalves, 2010.

O cofactor A (TBCA) foi o primeiro cofactor da tubulina a ser identificado (figura I.5.), tendo inicialmente sido designado por p14 (Campo et al., 1994). O TBCA liga monómeros de β -tubulina livre, actuando como um reservatório para o excesso desta subunidade de tubulina na célula (Archer et al., 1995), até esta ser transferida para o TBCD e também tem a capacidade de se ligar a β -tubulina proveniente da dissociação do heterodímero pela acção dos cofactores TBCB e TBCE (Llosa et al., 1996). Apesar de desempenhar estas funções, ensaios *in vitro* demonstraram que o TBCA não é essencial à via de *foldin* da tubulina, embora a sua presença aumente o rendimento da reacção (Tian et al., 1996). No entanto, o silenciamento do TBCA em células humanas por siRNA conduz uma diminuição da tubulina solúvel e a alterações no citoesqueleto de microtúbulos, que leva a uma paragem no ciclo celular em G1 e à morte celular, sendo por isso este cofactor essencial para a viabilidade celular (Nolasco et al., 2005).

A proteína Rb12p, homóloga do TBCA em *S. cerevisiae*, é também capaz de reverter a letalidade causada pela sobre-expressão da β -tubulina, mas a deleção do seu gene não é letal (Archer et al., 1995).

A planta *Arabidopsis thaliana* possui um gene homólogo do *tbca*, o gene *kiesel* (*kis*). Quando este gene é deletado as plantas apresentam fenótipos relacionados com defeitos na função dos microtúbulos: as células mutantes apresentam um tamanho reduzido, defeitos na meiose e na divisão celular, tricomas não ramificados e curtos e desorganização dos microtúbulos (Kirik et al., 2002a).

I.3.1.2 Cofactor B (TBCB)

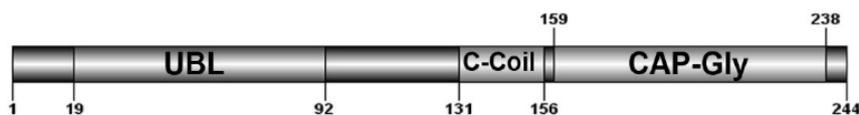


Figura I.6. TBCB. Representação esquemática dos domínios funcionais UBL – *ubiquitin-like*, C-Coil – domínio *coiled-coil* e CAP-Gly (Grynberg, Jaroszewski, & Godzik, 2003) presentes na proteína TBCB humana. Adaptado de Gonçalves, 2010.

O cofactor B (TBCB) foi identificado como sendo uma proteína que participa no *folding* da α -tubulina em ensaios *in vitro*. O TBCB actua capturando a α -tubulina na conformação *quasi-nativa* libertada pelo CCT formando um complexo binário com o TBCE. Na dissociação do heterodímero de tubulina em conjunto com o TBCE também se liga à α -tubulina (Kortazar et al., 2007; Tian et al., 1997). Como referido para o TBCA, este cofactor não é essencial à via de *folding* da tubulina, embora a sua presença aumente a produção de α -tubulina nativa (Tian et al., 1997). O TBCB apresenta um domínio CAP-Gly (*cytoskeleton-associated protein glycine-rich*) (figura I.6.) em comum com o TBCE e com as proteínas de ligação à extremidade “+” dos microtúbulos, as proteínas TIP+ (Peris et al., 2006). As proteínas TIP+ estão envolvidas na organização dos microtúbulos e no transporte de vesículas ao longo do citoesqueleto, estando o domínio CAP-Gly relacionado com a ligação aos microtúbulos através da ligação à α -tubulina (Galjart, 2005; (Bartolini et al., 2005)). O TBCB partilha também com o TBCE o domínio UBL (*ubiquitin-like*), que poderá estar ligado à formação do complexo entre o TBCB e o TBCE.

A proteína Pak1 (*p21-activated kinase 1*) é uma cinase de serina/treonina e participa na regulação dinâmica dos microtúbulos através da fosforilação do TBCB na Ser-65 e Ser-128 durante a fase de repolimerização dos microtúbulos após a despolimerização com nocodazole. Foi também observado que tanto o silenciamento de TBCB como de Pak1 em células de mamífero diminui a formação de novos microtúbulos, mas não afecta os níveis de α -tubulina. A sobre-expressão do TBCB em células de mamífero conduz à despolimerização da rede de microtúbulos (Kortazar et al., 2007; Vadlamudi et al., 2005), aumenta a actividade da Pak1 e conduz à amplificação do número de centrossomas. Este aumento do número de centrossomas e conseqüente aparecimento de fusos multipolares está associado à instabilidade genómica existente em tumores, o que pode indicar que a desregulação do TBCB está ligada à cancerigénese (Vadlamudi et al., 2005). O TBCB para além de fosforilado é

também nitrado pela actividade do óxido nítrico sintase, sendo estas modificações importantes para manter um balanço constante na dinâmica dos microtúbulos (Rayala et al., 2007).

O TBCB desempenha também um papel na dinâmica de microtúbulos e na plasticidade neuronal durante a neurogénese, uma vez que o silenciamento deste cofactor promove o crescimento dos axónios, enquanto que a sua sobreexpressão conduz à despolimerização dos microtúbulos e a danos nos axónios seguido de degeneração neuronal. Este estudo mostrou também que o TBCB se localiza no cílio primário, podendo apresentar uma função neste organelo (Lopez-Fanarraga et al., 2007).

Na levedura *S. cerevisiae* o TBCB é codificado pelo gene *alf1*, sendo que este gene não é essencial, mas a sua deleção causa hipersensibilidade ao agente despolimerizador de microtúbulo benomil (Tian et al., 1997).

Na planta *Arabidopsis thaliana* o gene *attfc b* é homólogo do *tbc b* de mamífero, sendo este gene essencial uma vez que quando é deletado provoca a letalidade no embrião, que consiste em uma ou poucas células multinucleadas (Du et al., 2010).

I.3.1.3 Cofactor C (TBCC)

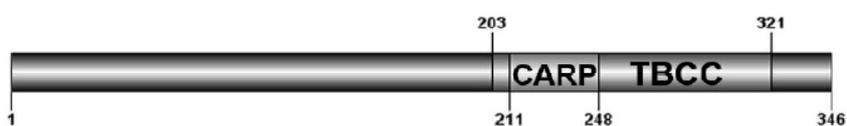


Figura I.7. TBCC. Representação esquemática dos domínios funcionais CARP e TBCC presentes na proteína TBCC humana. Adaptado de Gonçalves et al., 2010.

Cowan e seus colaboradores identificaram o cofactor C (TBCC) em ensaios *in vitro* de *folding* da tubulina como sendo uma proteína capaz de se ligar ao super-complexo α -tubulina/TBCE/ β -tubulina/TBCD e de induzir a libertação do heterodímero α/β -tubulina nativo (Tian et al., 1996). Mais ainda, foi demonstrado que este cofactor é crítico para o correcto *folding* da tubulina, uma vez que a sua actividade GAP (*GTPase activating protein*), em conjunto com o

TBCD, é necessária para a hidrólise do GTP pela β -tubulina, passo essencial para a libertação do heterodímero de α/β -tubulina a partir do super-complexo. Este processo é ainda mais eficiente na presença de TBCE (Tian et al., 1999, 1997).

O TBCC (figura I.7.) possui dois domínios funcionais no seu C-terminal, o domínio CARP e o domínio TBCC. A proteína RP2 (*retinitis pigmentosa protein 2*), que será discutida em particular mais à frente, possui também estes dois domínios funcionais no seu N-terminal. O domínio CARP encontra-se presente nas proteínas CAP, que se ligam à G-actina e regulam a sua polimerização (Bertling et al., 2004). O domínio TBCC apresenta propriedades funcionais relacionadas com a actividade GAP para com a tubulina, uma vez que foi demonstrado, através de um ensaio de complementação em levedura, que a expressão do TBCC e da RP2 de mamífero é capaz de reverter o fenótipo da deleção do gene *cin2*, gene homólogo do TBCC em levedura *S. cerevisiae*, confirmando a conservação da função entre estas proteínas. Particularmente, a mutação no resíduo de arginina conservado entre as proteínas TBCC (Arg262) e RP2 (Arg 118) no domínio TBCC, que poderá corresponder a um dedo de arginina característico das proteínas GAP e que é essencial para esta actividade, conduz uma incapacidade de reversão do fenótipo de deleção do CIN2 em levedura, uma vez que elimina a actividade GAP (Bartolini et al., 2002).

A sobre-expressão deste cofactor influencia a formação da rede de microtúbulos, uma vez que aumenta a quantidade de monómeros de tubulina não polimerizados, diminuindo a dinâmica dos microtúbulos. Nestas condições o ciclo celular encontra-se alterado, uma vez que se observou uma maior percentagem de células na fase G2-M e uma passagem para a mitose mais lenta (Hage-Sleiman et al., 2010).

A planta *Arabidopsis thaliana* possui também um gene homólogo do TBCC, designado por *Porcino* (*por*). Quando ocorre a deleção deste gene foi identificada uma desorganização do citoesqueleto de microtúbulos. Foi demonstrado que a expressão do TBCC humano em células com de *A. Thaliana* com o gene *Porcino* mutado é capaz de reverter o fenótipo, o que confirma a conservação da função das duas proteínas (Kirik et al., 2002b).

I.3.1.4 Cofactor D (TBCD)



Figura I.8. TBCD. Representação dos domínios funcionais *Armadillo* e *Heat* presentes na proteína TBCD humana. Estes domínios estão envolvidos nas interações proteína-proteína (Grynberg et al., 2003). Adaptado de Gonçalves, 2010.

O cofactor D (TBCD) (figura I.8.) foi identificado no mesmo estudo que o TBCC como sendo uma proteína que interage directamente com a β -tubulina e contribui para a polimerização dos heterodímeros de α/β -tubulina *in vitro* (Tian et al., 1996). O TBCD é também uma proteína destabilizadora de microtúbulos *in vivo* e *in vitro*, uma vez que quando incubado com o dímero de tubulina nativo, a β -tubulina ligada a GTP é eficientemente sequestrada pelo cofactor dando-se a dissociação do heterodímero (Martín et al., 2000; Tian et al., 1997). Para além disso, a sobre-expressão deste cofactor em células de mamífero aumenta a despolimerização dos microtúbulos, verificando-se a rápida diminuição dos níveis de α -tubulina, devido à sua degradação pelo proteossoma. Foi demonstrado também que este cofactor não se liga directamente aos microtúbulos (Martín et al., 2000).

Como referido anteriormente, o TBCD e o TBCC possuem actividade GAP para β -tubulina, sendo essenciais para que ocorra a hidrólise do GTP pela β -tubulina, que é necessária para a libertação do heterodímero de tubulina nativo a partir do super-complexo (Tian et al., 1999, 1997). Esta actividade GAP é regulada negativamente *in vitro* e *in vivo* através da interacção com a proteína Arl2, uma proteína GTPase da família das Arl. A proteína Arl2, preferencialmente na forma sua GDP, liga-se ao TBCD e impede a ligação deste à β -tubulina, prevenindo a dissociação do heterodímero de tubulina e a consequente despolimerização da rede de microtúbulos (Bhamidipati et al., 2000). Estudos recentes demonstraram que o TBCD e a Arl2 também se encontram ligados à fosfatase PP2A (*protein phosphatase 2A*), mas o significado biológico deste complexo ainda não é conhecido (Shern et al., 2003).

O complexo Arl2/ β -tubulina/TBCD, para além de regular a dinâmica dos microtúbulos, regula também a formação e manutenção dos epitélios. A sobreexpressão de TBCD em células

epiteliais leva a uma desorganização do epitélio. No entanto, na presença da proteína Arl2 este efeito é anulado, confirmando-se a regulação do TBCD por esta proteína (Shultz et al., 2008).

Recentemente, foi demonstrado que o TBCD é uma proteína centrossomal e que se encontra envolvido no recrutamento do complexo γ -TuRC, promovendo a polimerização dos microtúbulos e a organização do fuso mitótico (Cunningham & Kahn, 2008). O TBCD acumula-se nos centríolos e no corpo médio durante a citocinese, assim como nos corpos basais e cílios primários (Fanarraga et al., 2010a).

A sobre-expressão do TBCD, a níveis que não afectam os níveis de α - e β -tubulina nem a polimerização de microtúbulos, conduz à perda do complexo γ -TuRC e da nucleação dos microtúbulos no centrossoma (Cunningham & Kahn, 2008). Pelo contrário, a depleção do TBCD através da técnica de RNAi, resulta em problemas no centrossoma e corpo médio, na formação de cílios primários mais longos e em defeitos no fuso mitótico, nomeadamente fusos multipolares e monopolares, resultando em problemas na citocinese (Cunningham & Kahn, 2008; Fanarraga et al., 2010a). Este dados comprovam que o TBCD possui uma função importante nos centrossomas, especificamente na polimerização da tubulina, organização do fuso mitótico e na divisão celular (Fanarraga et al., 2010a).

O gene homólogo do *tbcd* em *S. cerevisiae* é designado por *cin1*, sendo que mutações neste gene não são letais, mas causam sensibilidade a dois agentes despolimerizadores de microtúbulos, o benomil e o frio. A sobreexpressão deste gene conduz a um fenótipo semelhante à perda de função, ou seja, uma elevada sensibilidade ao benomil (Hoyt et al., 1990).

O *tbcd* possui um gene homólogo em *Arabidopsis thaliana*, o *champignon* (*cho*). Os embriões onde este gene se encontra mutado apresentam apenas algumas células de grandes dimensões, rodeadas por endosperma, que por sua vez apresenta núcleos muito grandes. Estes dados sugerem que a divisão celular poderá estar afectada (Steinborn et al., 2002).

I.3.1.5 Cofactor E (TBCE)



Figura I.9. TBCE. Representação esquemática dos domínios funcionais CAP-Gly, LRR e UBL existentes na proteína TBCE humana (Grynberg et al., 2003). Adaptado de Gonçalves, 2010.

O Cofactor E (TBCE), um dos cinco cofactores específicos da tubulina, foi identificado como sendo capaz de se ligar α -tubulina na via de *folding* da tubulina e formar um complexo com o TBCC, o TBCD e β -tubulina (Tian et al., 1996). Como referido anteriormente, o TBCE aumenta a actividade GAP do TBCC e TBCD, promovendo a libertação do heterodímero de tubulina nativo (Tian et al., 1999). O TBCE apresenta um domínio CAP-Gly (figura I.9.) em comum com o TBCB e as proteínas TIP+, domínio que contribui para a ligação à α -tubulina (Bartolini et al., 2005). No entanto apresenta também um domínio com dez repetições ricas em leucinas (LRR – *leucine-rich repeats*), envolvido em interacções proteína-proteína, e um domínio UBL (*ubiquitin-like*) (Grynberg et al., 2003).

O TBCE possui uma proteína homóloga em *S. cerevisiae*, a proteína PAC2 (Tian et al., 1996). O gene *pac2* não é essencial, mas a sua deleção cria uma sensibilidade aos agentes despolimerizadores de microtúbulos benomil e frio (Hoyt et al., 1997). Estudos com a proteína Pac2 demonstraram que esta proteína forma complexos com a α -tubulina, liga-se aos microtúbulos através do domínio CAP-Gly e a componentes do proteossoma, através dos seus domínios LRR e UBL. Pelo contrário o TBCE de mamífero não se liga aos microtúbulos (Voloshin et al., 2010).

O TBCE tem também a capacidade de participar no processo de dissociação do heterodímero de tubulina (Tian et al., 1997). De facto a sobre-expressão do TBCE em células de mamífero, assim como do TBCD, conduz à despolimerização dos microtúbulos e ao desaparecimento de α - e β -tubulina nas células, sugerindo uma rápida degradação das subunidades de tubulina (Bhamidipati et al., 2000). Adicionalmente, esta despolimerização da rede de microtúbulos é mais eficiente quando o TBCE é sobre-expresso em conjunto com o TBCB, uma vez que os dois

cofactores formam um complexo que se liga à α -tubulina, promovendo a dissociação do heterodímero de tubulina (Kortazar et al., 2007).

Foram identificadas mutações o gene do TBCE associadas a um grupo de doenças neurodegenerativas graves e raras. O TBCE possui um papel importante no desenvolvimento da paratiróide, visto que está envolvido na patogénese do síndrome de Sanjad-Sakati, ou síndrome HRD (*hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism*), uma doença recessiva autossomal muito grave. Estes fenótipos estão associados a uma rede de microtúbulos com defeitos (Parvari et al., 2007; Tian et al., 2006).

Na planta *Arabidopsis thaliana* o gene *pfifferling* (*pfi*) codifica uma proteína homóloga do TBCE, sendo que mutações neste gene causam a letalidade no embrião e provocam fenótipos semelhantes aos identificados nos mutantes nas proteínas homólogas ao TBCC e TBCD (Steinborn et al., 2002).

I.4 Família de proteínas relacionadas com os cofactores da tubulina

I.4.1 Proteína *E-like*

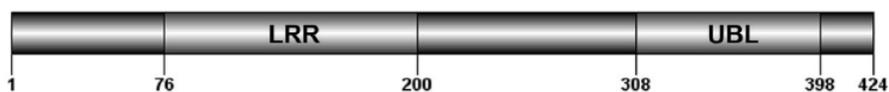


Figura I.10. Proteína *E-like*. Representação esquemática dos domínios funcionais LRR e UBL presentes na *E-like* humana (Bartolini et al., 2005). Adaptado de Gonçalves, 2010.

Através de um estudo com a finalidade de encontrar proteínas relacionadas com os cofactores da tubulina, Cowan e seus colaboradores identificaram uma proteína relacionada com o TBCE, tendo por isso sido designada por *E-like*. Esta proteína apresenta uma sequência semelhante ao TBCE, uma vez que partilham os domínios *leucine-rich repeats* (LRR) e *ubiquitin-like domain* (UBL), não possuindo, no entanto, o domínio CAP-Gly (figura I.10.). O papel destes domínios na

função do TBCE ainda é desconhecido, apesar de serem considerados domínios de interação entre proteínas (Bartolini et al., 2005).

Apesar das semelhanças a nível da sequência, as proteínas TBCE e *E-like* são funcionalmente distintas, uma vez que o *E-like* não consegue substituir o TBCE na via de *folding* da tubulina, nem aumentar a hidrólise do GTP pela β -tubulina *in vitro* (Bartolini et al., 2005). No entanto, a sobre-expressão deste em células de mamífero, tal como do TBCE (Tian et al., 2006), causa a despolimerização dos microtúbulos através da dissociação do heterodímero de tubulina e direcciona este para a degradação proteolítica pelo proteossoma, levando à desorganização do Complexo de Golgi. Pelo contrário, a supressão da expressão do *E-like* por siRNA resulta num aumento do número de microtúbulos estáveis e na reorganização de membranas endocelulares sem alterar as propriedades da dinâmica dos microtúbulos (Bartolini et al., 2005).

I.4.2 Família de proteínas que contém o domínio TBCC: TBCC, RP2 e TBCCD1

Recentemente, na sequência de uma pesquisa na base de dados do genoma humano com o objectivo de encontrar proteínas humanas relacionadas com os cofactores da tubulina em termos de sequência e domínios funcionais, foi identificada uma nova proteína relacionada com o TBCC, o TBCCD1 (*TBCC-domain containing protein 1*), uma vez que possui o domínio funcional TBCC (Gonçalves et al., 2010a). A proteína RP2 (*Retinitis pigmentosa protein 2*) está igualmente relacionada com o TBCC, uma vez que apresenta também homologia nesse domínio (Schwahn et al., 1998) (figura I.11.).

Para além do domínio TBCC, as proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1 possuem um motivo CARP, um domínio funcional descrito nas proteínas CAP (*cyclase-associated proteins*). As CAP são proteínas conservadas em todos os organismos que se ligam a monómeros de G-actina e estão envolvidas na polimerização do citoesqueleto de actina, na endocitose e transporte vesicular (Hubberstey & Mottillo, 2002). O domínio CARP encontra-se sobreposto ao domínio TBCC. (figura I.11.).

Ambos os domínios encontram-se na região C-terminal do cofactor C e do TBCCD1 e na região N-terminal da RP2 (figura I.11.).

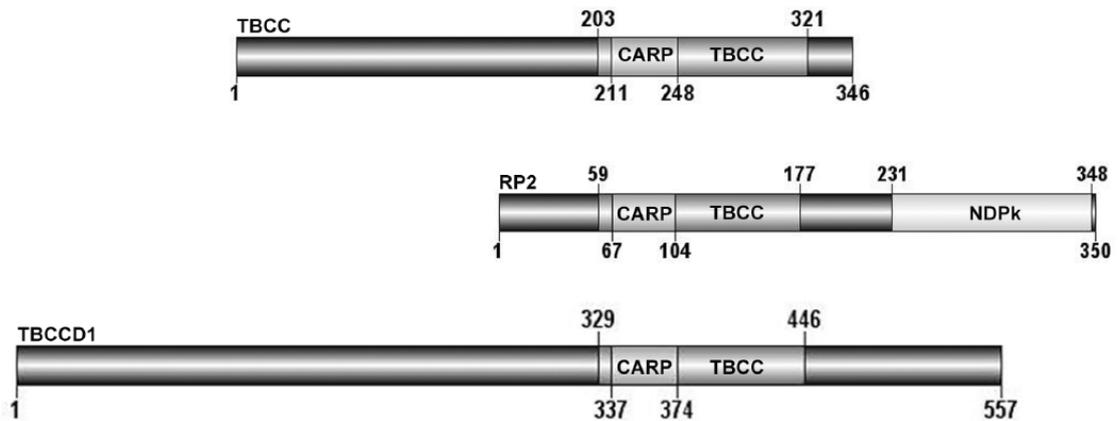


Figura I.11. Proteínas que contém o domínio TBCC. Representação esquemática dos domínios funcionais TBCC e CARP presentes nas proteínas humanas TBCC, RP2 e TBCCD1. Adaptado de Gonçalves et al., 2010.

I.4.2.1 Retinitis pigmentosa protein 2 (RP2)

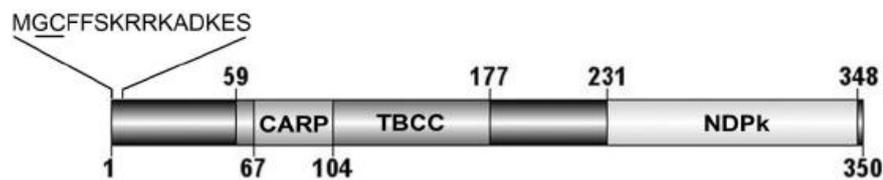


Figura I.12. Proteína RP2. Representação esquemática dos domínios funcionais CARP, TBCC e NDPk presentes na proteína RP2. Está também representada a sequência de resíduos de aminoácidos onde ocorrem as modificações pós-traducionais da proteína. Os resíduos sublinhados (G e C) sofrem miristoilação e palmitoilação, respectivamente, e são cruciais para a localização da proteína na membrana plasmática (Chapple et al., 2000).

A proteína RP2 (*retinitis pigmentosa protein 2*) humana é uma proteína expressa ubiquamente e constituída por 350 resíduos de aminoácidos. O gene *X-linked retinitis pigmentosa* (XLRP) codifica esta proteína e está implicado numa forma da doença retinite pigmentosa associada ao cromossoma X, caracterizada pela degeneração progressiva da retina resultando em cegueira. Este gene aparece mutado em aproximadamente 18% dos pacientes com XLRP. A

proteína RP2 está relacionada com o TBCC, uma vez que partilha com ele os domínios funcionais CARP e TBCC (figura I.12.), como referido anteriormente, sugerindo um possível papel na via de *foldi*ng da tubulina. Esta relação entre as duas proteínas é suportada pela identificação de mutações pontuais patogénicas na RP2 em resíduos conservados com o TBCC (Chapple et al., 2000; Schwahn et al., 1998).

Na região C-terminal a RP2 apresenta um domínio NDPk (*nucleoside diphosphate kinase*) (figura I.12.), característico dos enzimas nucleotídeo-difosfato-cinases que estão envolvidos na transferência de grupos fosfato. No entanto, através de ensaios bioquímicos foi demonstrado que a RP2 não possui esta actividade, resultado que pode ser explicado pela ausência do resíduo de histidina essencial para a actividade enzimática. Contudo, a proteína RP2 apresenta uma capacidade de ligação ao DNA e uma actividade de exonuclease 3'-5', função partilhada com a NDK1 humana. Estes resultados sugerem que a RP2 humana tenha um papel na reparação de danos do DNA (Yoon et al., 2006).

Estudos para determinar a localização celular da RP2 demonstraram que esta proteína se localiza na membrana plasmática e no citoplasma de células de mamífero, quer por imunofluorescência usando anticorpos gerados contra a proteína, quer através da expressão da proteína em fusão com proteínas fluorescentes (GFP). No entanto, a sua localização é variável dependendo da linha celular utilizada. A localização membranar da RP2 depende de modificações pós-traducionais, como a miristoilação e palmitoilação, num motivo presente na região N-terminal, uma vez que mutações nos resíduos Gly2 e Cys3, leva à perda desta localização pela proteína (figura I.12.) (Chapple et al., 2000; Schwahn et al., 2001). Através de uma análise filogenética observou-se que a proteína RP2 está apenas presente nos organismos que possuem cílios/flagelos (Stephan et al., 2007).

Dado que as proteínas RP2 e TBCC partilham o domínio funcional TBCC, foi testado se existiria uma partilha de funções entre as proteínas. Neste estudo verificou-se que ambas as proteínas estimulam a actividade GTPase da β -tubulina nativa, em cooperação com o TBCCD. No entanto, apenas o TBCC participa na formação de novos heterodímeros de tubulina, não sendo a RP2 capaz de o substituir na via de *foldi*ng da tubulina. Observou-se também que a mutação no único resíduo de arginina conservado entre a RP2 e o TBCC (Arg118 da RP2 e Arg262 no TBCC), identificada em pacientes com retinite pigmentosa, provoca uma perda total da actividade GAP em ambas as proteínas. Este resíduo de arginina é de extrema importância para a actividade das duas proteínas, uma vez que deverá constituir um dedo de arginina, característico das proteínas GAP (Bartolini et al., 2002).

A sobreposição de funções entre a RP2 e o TBCC foi também testada através de um ensaio de complementação em levedura, tendo sido verificado que tanto o TBCC como a RP2 são capazes de reverter parcialmente o fenótipo de sensibilidade ao benomil, agente despolimerizador de microtúbulos, provocado pela deleção do gene homólogo do TBCC, *cin2*. Assim, estes resultados indicam que as duas proteínas têm uma sobreposição de funções mas não são totalmente idênticas (Bartolini et al., 2002).

O mesmo estudo mostrou também que a proteína RP2 se liga à Arl3 (*ADP ribosylation factor-like protein 3*), que pertence à família as pequenas GTPases Arl, na qual se encontra inserida a Arl2, já referida anteriormente, sendo esta ligação dependente de GTP (Bartolini et al., 2002). A ligação entre as duas proteínas aumenta quando a RP2 não se encontra miristoilada. A proteína Arl3 foi identificada em estruturas de microtúbulos das células da retina e no cílio conector das células fotoreceptoras. No entanto, não foi identificada na membrana plasmática, sugerindo que este não é o local de interacção com a proteína RP2 (Grayson et al., 2002). Posteriormente, foi demonstrado que a proteína RP2 tem actividade GAP para a Arl3, sendo o resíduo de arginina conservado crucial para esta função (Veltel et al., 2008).

Estudos recentes sobre a localização da proteína RP2 em células fotoreceptoras demonstraram esta se co-localiza com a proteína centrina-3 e que se encontra no corpo basal do cílio conector, nos centríolos da base do cílio, na região peri-centriolar e no complexo de Golgi. A localização no corpo basal é dependente da miristoilação da RP2. Estas localizações sugerem um papel da proteína RP2 no tráfico peri-centriolar de vesículas e no transporte intraflagelar. Tanto o silenciamento da RP2 como da Arl3 através da técnica RNAi conduz a uma dispersão e fragmentação do complexo de Golgi e uma conseqüente diminuição do transporte vesicular deste organelo para o corpo basal do cílio. Estes dados sugerem que a regulação negativa da Arl3 pela RP2 é essencial para o tráfico de vesículas do complexo de Golgi para a base do cílio (Evans et al., 2010). Dada a localização da RP2 no cílio conector, foram desenvolvidos estudos em *Trypanosoma brucei* que comprovam este resultado, encontrando-se a proteína no corpo basal do flagelo. Foi também sugerido que a proteína RP2 poderia participar no mecanismo de controlo de qualidade da tubulina, actuando no corpo basal do flagelo (Stephan et al., 2007).

I.4.2.2 TBCC-domain containing protein 1 (TBCCD1)

O TBCCD1 é uma proteína centrossomal que foi recentemente descrita e caracterizada em *Chlamydomonas reinhardtii* e células humanas (Feldman & Marshall, 2009; Gonçalves et al., 2010a). Através de um estudo filogenético observou-se que o TBCCD1 é conservado na maioria dos organismos analisados, com excepção das leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe* e ainda *H. magnipapillata* e *D. melanogaster* (Gonçalves, 2010).

A proteína TBCCD1 é constituída por 557 aminoácidos, uma massa molecular prevista de ~64 kDa e um pI previsto de 8.8688. O gene humano que codifica esta proteína, *tbccd1*, localiza-se no cromossoma 3 (3q27.3) e possui 8 exões (Gonçalves, 2010). Esta proteína está relacionada com o TBCC e RP2, uma vez que as três proteínas partilham dois domínios funcionais: CARP e TBCC (figura I.13.).



Figura I.13. Proteína TBCCD1 humana. Representação esquemática dos domínios funcionais CARP e TBCC presentes na proteína TBCCD1 humana.

Como referido anteriormente, a actividade GAP para a β -tubulina das proteínas TBCC e RP2 é dependente de um resíduo de arginina conservado entre as duas proteínas no domínio TBCC (Veltel et al., 2008) e que constituirá um dedo de arginina característico de proteínas com esta função (Gonçalves, 2010). O TBCCD1 humano, apesar de partilhar o domínio funcional TBCC com as duas proteínas TBCC e RP2, não possui o resíduo de arginina conservado entre ambas as proteínas crucial à actividade GAP. No entanto, esta proteína possui um resíduo de arginina próximo dessa posição, tendo sido proposto que poderia desempenhar a mesma função (Feldman & Marshall, 2009; Gonçalves et al., 2010a). Assim, a presença de actividade GAP do TBCCD1 foi avaliada através de um ensaio de complementação em *S. cerevisiae*, onde foi observado que esta proteína é incapaz de reverter o fenótipo da deleção do gene *cin2*, gene homólogo do TBCC em levedura, sugerindo que o TBCCD1 não possui a função de activar GTPases. Este resultado poderá estar relacionado com a ausência no TBCCD1 do resíduo de

arginina conservado entre o TBCC e RP2, como referido anteriormente (Gonçalves et al., 2010a).

A localização celular do TBCCD1 foi determinada por microscopia de fluorescência usando a expressão de proteínas de fusão com proteínas fluorescentes e com um anticorpo específico para o TBCCD1. A proteína localiza-se no citoplasma, no centrossoma, nos pólos do fuso mitótico durante todas as etapas da mitose, na zona mediana do fuso mitótico na anafase, no corpo médio do fuso e no corpo basal de cílios primários e motores em diferentes linhas celulares humanas (figura I.14.) (Gonçalves et al., 2010a). A localização centrossomal do TBCCD1 foi também observada na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, especificamente nos centríolos dos dois flagelos e no rizoplasto, estrutura envolvida na associação dos dois centríolos ao núcleo da célula (Feldman & Marshall, 2009).

O facto de o TBCCD1 ter uma localização centrossomal sugere que esta proteína tenha um papel importante nesta estrutura. No entanto, o organismo *A. thaliana*, que sendo uma planta não possui centrossoma, apresenta duas proteínas ortólogas do TBCCD1. Assim, a presença de proteínas TBCCD1 não está directamente relacionada com a presença de centrossomas e centríolos nem com a presença de cílios/flagelos e consequentemente de corpo basal (Gonçalves, 2010).

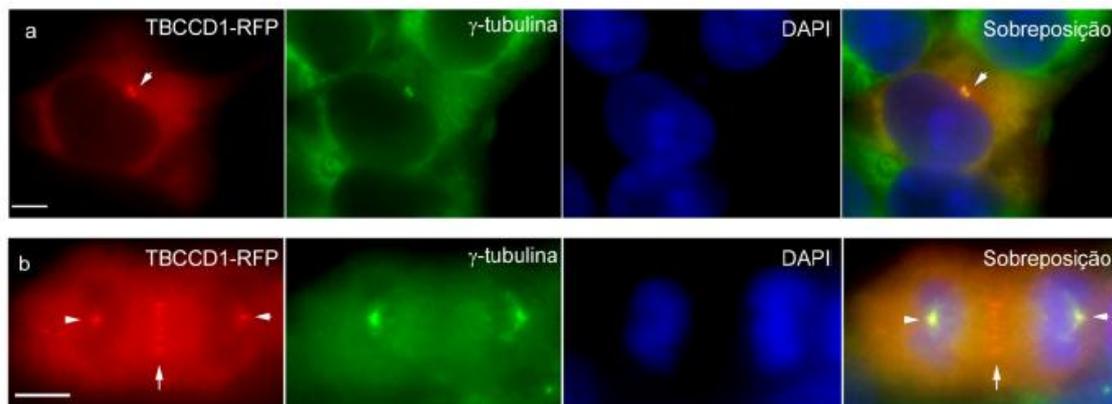


Figura I.14. Localização celular do TBCCD1 em células humanas. Nas células transfectadas com o plasmídeo pIC112-TBCCD1 para se expressar a fusão TBCCD1-RFP a proteína localiza-se no centrossoma tanto em (a) células em interfase como em (b) células em mitose; As cabeças de setas apontam para o TBCCD1-RFP nos centrossomas (a, b) e as setas apontam para o TBCCD1-RFP na zona mediana do fuso em anafase (b). As células HEK 293T foram processadas para imunofluorescência com anticorpo contra γ -tubulina e o DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010).

O TBCCD1 é uma proteína integral do centrossoma e esta localização é independente dos microtúbulos, uma vez que a sua localização permaneceu inalterada quando se despolimerizou a rede de microtúbulos com nocodazole (Gonçalves et al., 2010a). O domínio que determina a localização centrossomal da proteína TBCCD1 encontra-se na sua região N-terminal (1-328aa). De facto a expressão apenas da região N-terminal ou da região C-terminal em fusão com proteínas fluorescentes revelou que apenas a região N-terminal se localiza no centrossoma (Gonçalves et al., 2010a), ver figura I.15.

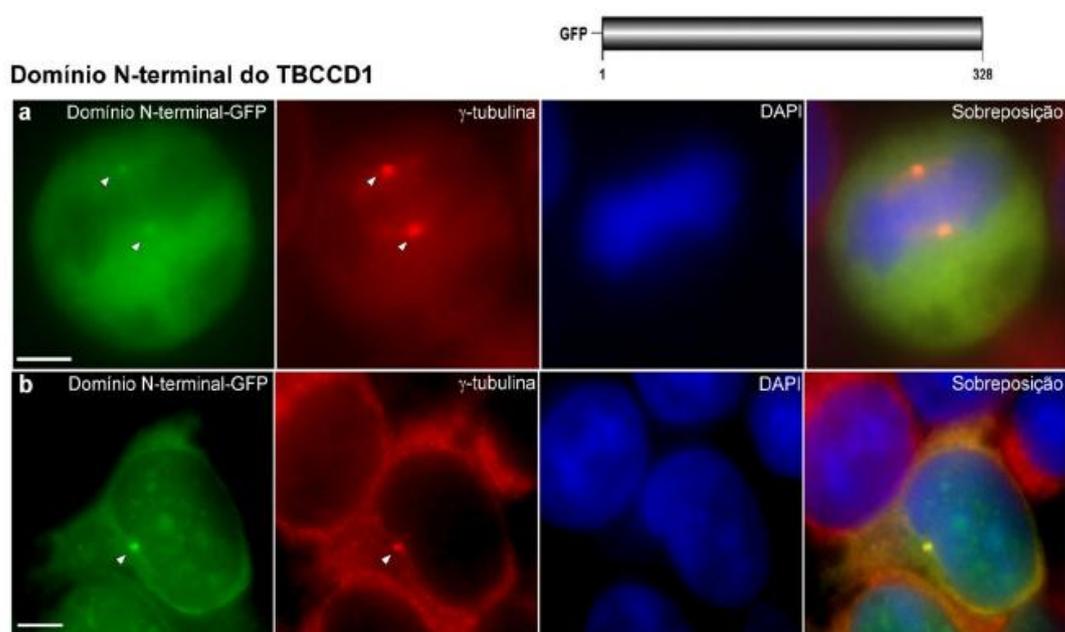


Figura I.15. A região N-terminal é responsável pela localização centrossomal do TBCCD1. Nas células transfectadas com a região N-terminal do TBCCD1 em fusão com GFP observou-se a localização centrossomal da proteína durante a (a) mitose e (b) interfase. As cabeças de setas apontam para a proteína de fusão e para a γ -tubulina nos centrossomas. Células HEK 293T foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com um anticorpo contra a γ -tubulina e o DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010).

Estudos realizados com soro anti-TBCCD1 demonstraram que a proteína TBCCD1 é expressa em diferentes linhas celulares humanas, apresentando níveis diferentes de expressão para cada linha. Os níveis da proteína aumentam na fracção nuclear, o que suporta a localização do

TBCCD1 endógeno no centróssoma, dada a associação desta estrutura ao núcleo. O TBCCD1 é também expresso em diversos órgãos de murganho, principalmente nos testículos e no cérebro, os dois órgãos onde foi detectada uma maior quantidade de tubulina (Gonçalves et al., 2010a). A expressão do gene *tbccd1* foi também analisada através da técnica de RT-PCR em diversos tecidos de murganho e linhas celulares. O gene *tbccd1* é transcrito em todas as linhas celulares estudadas e em todos os tecidos de murganho, sendo o seu mRNA mais abundante nos testículos. Assim, a expressão do *tbccd1* é ubíqua (Gonçalves et al., 2010a). Os níveis de TBCCD1 são sensíveis à exposição ao H₂O₂ a concentrações sinalizadoras, levando a um aumento dos níveis da proteína ao longo do tempo e a um aumento da velocidade de consumo do H₂O₂. Estes dados sugerem que o H₂O₂ poderá modular esta proteína (Carvalho, 2010).

De forma a ser estudada a função da proteína TBCCD1 humana, o gene *tbccd1* foi silenciado em células RPE-1 pela técnica de RNAi. O silenciamento do gene *tbccd1* provoca um aumento de tamanho das células transfectadas, não atingindo estas a confluência como as células controlo, o que sugere um atraso no ciclo celular na fase G1. Nas células silenciadas para o *tbccd1* o centróssoma encontra-se deslocado do centro da célula, havendo um aumento da distância deste ao núcleo e apresentando-se frequentemente na periferia da célula, ver figura I.16.. Estes resultados mostraram que o TBCCD1 é necessário para o correcto posicionamento do centróssoma no centro da célula em associação com o núcleo (Gonçalves et al., 2010a).

Outro fenótipo encontrado nas células em que o *tbccd1* foi silenciado é a desorganização do complexo de Golgi, encontrando-se este muitas vezes fragmentado e espalhado por toda a célula ou parecendo seguir o centróssoma (figura I.16.). O silenciamento do *tbccd1* causa também problemas tanto na migração celular como na migração celular direccionada, sendo esta mais lenta do que no controlo. Para além disso, há uma diminuição da eficiência de produção de cílios primários nas células com depleção de TBCCD1, o que poderá estar relacionado com a desorganização do complexo de Golgi (Gonçalves et al., 2010a).

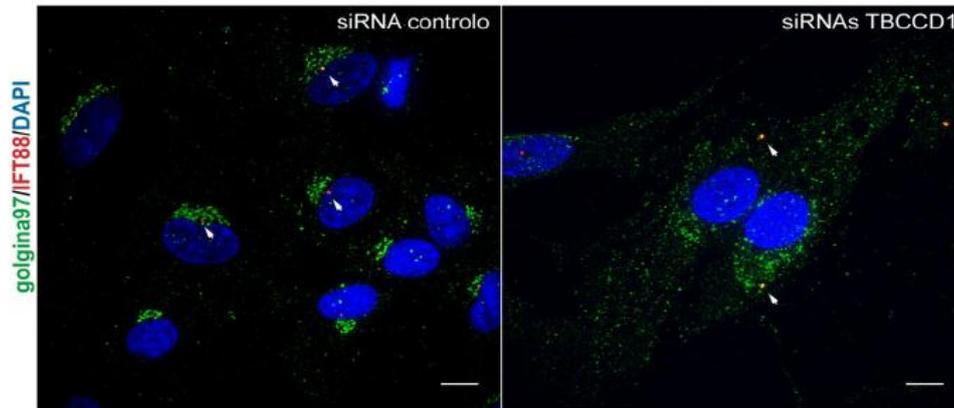


Figura I.16. Silenciamento do *tbccd1* provoca um afastamento do centróssoma relativamente ao núcleo e a desorganização do complexo de Golgi. As células RPE-1 transfectadas com o siRNA controlo ou contra o gene *tbccd1* foram processadas para análise por imunofluorescência com anticorpos contra a proteína golgina 97, marcador do Golgi, e contra a proteína IFT88/polaris, marcador do centróssoma. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 10 μm (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010).

Na alga verde *C. reinhardtii* o TBCCD1 tem um papel semelhante, pois células mutantes *asq2* com uma inserção na sequência codificante do gene *tbccd1*, resultando na perda da expressão do mesmo, apresentam problemas no posicionamento e na ligação entre os centríolos, o que conduz a falhas na orientação correcta do fuso mitótico. Estas células possuem ainda um número alterado de centríolos e flagelos (Feldman & Marshall, 2009). O número aberrante de flagelos indica que o TBCCD1 não é necessário para a sua formação, mas está provavelmente envolvido na regulação da via de associação dos centríolos.

Os dados disponíveis mostram que existe uma conservação na localização do TBCCD1 nos centríolos e que esta é uma proteína importante para o posicionamento do centróssoma e para a associação núcleo-centrússoma, assim como para a progressão do ciclo celular, a organização do Golgi, a ciliogénese e a divisão e migração celular.

II – Objectivos

O estudo do papel dos cofactores da tubulina na regulação da biossíntese e dinâmica do citoesqueleto de microtúbulos e como esta regulação é modulada por concentrações reguladoras de H_2O_2 , é um dos objectivos de investigação do grupo onde o trabalho aqui apresentado se insere. Nos últimos anos a descoberta e caracterização de proteínas relacionadas em termos de sequência e função com os cofactores da tubulina TBCC e TBCE, como a RP2 e a E-like respectivamente, e o facto de ambas apresentarem um papel relacionado com os microtúbulos, sugeriu a possibilidade de existirem outras proteínas relacionadas com os cofactores da tubulina. Assim, com o objectivo de encontrar novas proteínas relacionadas em estrutura e função com os cofactores da tubulina, realizou-se um estudo bioinformático com os genomas de vários organismos, o que levou à identificação da proteína TBCCD1 (*TBCC-domain containing protein 1*).

Como referido na introdução, o TBCCD1 é uma proteína centrossomal que tem um papel crítico na ligação centrossoma-núcleo, e que é relacionada com as proteínas TBCC e RP2, uma vez que possui um domínio TBCC. Esta proteína foi recentemente descrita e caracterizada em *Chlamydomonas reinhardtii* e linhas celulares humanas (Feldman & Marshall, 2009; Gonçalves et al., 2010a), sendo estes os únicos trabalhos existentes sobre esta proteína.

Assim, o trabalho aqui apresentado teve como principal objectivo o estudo da função biológica da proteína TBCCD1, nomeadamente o seu possível envolvimento em processos dependentes dos microtúbulos e ancoramento do centrossoma ao núcleo, assim como contribuir para a determinação de parceiros moleculares e para o estabelecimento da estrutura tridimensional da proteína. Para tal, o trabalho teve como objectivos específicos a determinação e caracterização dos domínios da proteína envolvidos nas suas funções através da utilização de formas mutadas da proteína TBCCD1 humana expressas em diferentes linhas celulares humanas que assim foram usadas como modelos biológicos.

Especificamente, com a realização deste trabalho pretendeu-se:

- a) Determinar qual o domínio mínimo da região N-terminal da proteína TBCCD1 responsável pela sua localização centrossomal.

b) Estudar a função da proteína TBCCD1 humana em linhas celulares humanas através da construção de formas mutadas da proteína ligadas à proteína GFP e da caracterização dos fenótipos das células transfectadas, analisando por exemplo: (i) a localização intracelular da proteína TBCCD1 mutada; (ii) o impacto na ligação do centrosoma ao núcleo; (iii) o impacto das proteínas TBCCD1 mutadas na função nucleadora de microtúbulos dos centrosomas, e (iv) possíveis alterações do citoesqueleto de microtúbulos e actina por técnicas de imunofluorescência indirecta.

c) Estudar o papel desempenhado pela proteína TBCCD1 na ciliogénese analisando a capacidade das células transfectadas com as formas mutadas da proteína TBCCD1 para montarem cílios primários.

III – Materiais e Métodos

III.1 Reagentes

Os meios de cultura Dulbecco's modified Eagles's medium DMEM 1x com Glutamax e DMEM/F-12 (Ham) (1:1) 1x com Glutamax, os aminoácidos não essenciais, a solução tampão fosfato salino PBS 10x e a tripsina (0,05%) 1x com EDTA para a cultura de células de mamífero foram adquiridos da GIBCO™, Invitrogen, assim como a Lipofectamine 2000 e o Optimem. Os antibióticos penicilina e estreptomicina foram obtidos da HyClone®, Thermo Scientific.

O metanol, o etanol, o Tween 20 e o cloreto de sódio (NaCl) provieram da Merck. O dimetilsulfóxido (DMSO), o Tris-Base, a solução de azul de tripano 0,4%, a Poli-L-Lisina e o 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foram adquiridos da Sigma. O glicerol adveio da Fluka. A albumina do soro bovino (BSA) para imunofluorescência e o meio de montagem MOWIOL 4-88 foram obtidos da Calbiochem®. A Bacto peptona, o Bacto agar e o extracto de levedura foram adquiridos da Difco.

O anticorpo Anti- γ -tubulina foi adquirido da Sigma, clone T6557, e o anticorpo Anti-murganho Alexa 594 foi obtido da Molecular Probes. A faloidina foi obtida da Invitrogen Molecular Probes.

Todos os *primers* utilizados foram produzidos pela Sigma. O enzima ligase de DNA do fago T4 foi obtido da Fermentas. O GreenSafe, o marcador de massas moleculares de DNA NZYLadder III, o enzima polimerase de DNA, NZY Premium DNA polimerase e os kits NZYGelpure e NZYMidiprep foram adquiridos da Nzytech. O Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit e o ZR Plasmid Miniprep™-Classic foram obtidos da ZYMO RESEARCH. O Plasmid Midi Kit foi adquirido da QIAGEN.

III.2 Equipamento

As linhas celulares utilizadas neste estudo foram mantidas numa estufa Snijders CO190TC-20, com uma atmosfera de 90% (v/v) de humidade e com 5% (v/v) de CO₂, e manuseadas numa câmara de fluxo laminar vertical Danlaf VFRS 1206. Para a visualização e contagem de células recorreu-se a um microscópio de contraste de fase Olympus CK40.

Foram utilizadas várias centrífugas: Centrifuge 5415 D da eppendorf, Sigma 4K10 e Sigma 202 MK.

As preparações de imunofluorescência foram observadas no microscópio de fluorescência Leica DMRA2 e no Sistema Deltavision.

As reacções de PCR foram efectuadas nos termocicladores Mastercycler Personal (Eppendorf) e Peltier Thermal Cycler – 100 (MJ Research). Os produtos de PCR foram analisados através de um sistema de electroforese de DNA da BIORAD, usando uma fonte de tensão Bio Rad PAC200. As bandas de DNA foram visualizadas e fotografadas utilizando um transiluminador (UV) Kodak EDAS 290.

III.3 Linhas celulares

As linhas celulares humanas utilizadas neste trabalho foram as seguintes: HEK 293T, hTERT e HeLa. A linha celular HEK 293T provém do epitélio do rim embrionário humano. A linha celular HeLa é uma linha celular transformada que advém do epitélio do adenocarcinoma cervical humano. Os três tipos de linhas celulares apresentam uma morfologia epitelial e um crescimento aderente.

As células 293T foram utilizadas neste estudo devido à sua grande eficiência de transfecção com plasmídeos e também pela sua capacidade de formar cílios primários sob privação de soro.

III.3.1 Condições de cultura celular

As linhas celulares HEK 293T e HeLa foram cultivadas em meio de cultura DMEM com Glutamax, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), aminoácidos não essenciais e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

A linha celular RPE-1 foi cultivada em meio de cultura DMEM/F-12 com Glutamax, suplementado com 10% (v/v) de FBS, aminoácidos não essenciais e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

Todas as linhas celulares foram mantidas numa estufa a 37°C, com 5% CO₂ e atmosfera húmida.

As células foram passadas a cada 2-3 dias, dependendo da sua confluência, de forma a garantir que se mantinham em fase de crescimento exponencial e em monocamadas subconfluentes. Caso a confluência das células se encontrasse abaixo dos 60-70%, procedia-se apenas à substituição do meio de cultura por meio fresco e pré-aquecido. Para a passagem das células, como as linhas celulares utilizadas neste trabalho crescem aderentes à superfície da placa de cultura, foi necessário efectuar um tratamento com tripsina 0,05%, durante 5 minutos a 37°C, de modo a que as mesmas fiquem em suspensão, permitindo a sua passagem e contagem quando necessário. A reacção foi parada com a adição de meio de cultura e as células foram plaqueadas numa caixa nova.

III.3.2 Contagem de células

De forma a ter um número exacto de células nas placas de cultura para os diferentes trabalhos experimentais, estas foram contadas após lavagem com PBS 1x e tratamento com tripsina, com a ajuda de um hemocítmetro. Para a contagem de células vivas foi utilizado o marcador vital azul de tripano, que cora a azul tecidos e células mortas. Assim as células vivas foram contadas selectivamente e distribuídas em placas de cultura, de acordo com a experiência a realizar.

III.4 Estirpes bacterianas e condições de cultura

A amplificação de DNA plasmídico foi feita recorrendo-se à estirpe de *E. coli* JM109 (NEB) (genótipo: endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F⁺ traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15] hsdR17(r_k⁻m_k⁺)).

A estirpe foi cultivada em meio de cultura LB líquido (bactopeptona 10 g/L, extracto de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L), a 37°C com agitação, ou em meio de cultura LB sólido (com agar 20 g/L) a 37°C, ambos suplementados com o antibiótico apropriado (ampicilina 100 µg/mL) após a transformação das bactérias. De modo a conservar as células durante grandes períodos de tempo, estas foram guardadas a -80°C em meio LB suplementado com 15% (v/v) de glicerol, quando se encontravam na fase exponencial.

III.4.1 Preparação de células de *E. coli* competentes

De modo a tornar as células de *E. coli* competentes para poderem ser transformadas com DNA plasmídico, uma pré-cultura foi colocada a crescer em meio líquido durante a noite a 37°C e com agitação. Na manhã seguinte foi preparada uma cultura em meio líquido a partir da pré-cultura, a uma absorvência a 600 nm de 0,075 OD e incubada a 37°C com agitação, até atingir uma absorvência de 0,3 OD a 600 nm. As etapas seguintes foram todas realizadas a uma temperatura de 4°C. As células foram centrifugadas a 7000 rpm numa centrífuga *ependorf* durante 2 minutos e o sedimento celular foi ressuscitado em ½ do volume inicial da cultura de células numa solução de MgCl₂ 0,1M. A suspensão de células foi novamente centrifugada a 7000 rpm durante 2 minutos e o sedimento celular foi ressuscitado em ½ do volume inicial com uma solução de CaCl₂ 0,1M, e deixado a repousar no gelo a 4°C durante 20 minutos. De seguida procedeu-se a uma nova centrifugação da suspensão de células nas mesmas condições anteriores, sendo o sedimento celular ressuscitado em 1/50 do volume inicial numa solução de CaCl₂ 0,1M com glicerol a 15% (v/v).

As células competentes foram rapidamente congeladas e guardadas a -80°C, até serem utilizadas na transformação de DNA plasmídico.

III.5 Clonagem de fragmentos de DNA em vectores de expressão

III.5.1 Amplificação de sequências DNA por PCR

Para a clonagem de fragmentos de DNA em vectores de expressão em células de mamífero, primeiramente recorreu-se à técnica de PCR, de forma a amplificar as sequências de DNA de interesse a clonar. A amplificação das sequências de DNA foi feita em reacções de PCR com um volume final de 25 ou 50 μL [30 ng/ μL de cada *primer*, Tampão de PCR 1x (200 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM KCl, 20 mM MgSO_4 , 1 mg/ml of nuclease-free BSA, 1% (v/v) Triton X-100), 2mM dNTP], utilizando polimerases de DNA (NZY Premium DNA polimerase), a partir de amostras de DNA plasmídico contendo as sequências alvo clonadas. Todos os *primers* utilizados na amplificação das sequências de DNA desejadas, foram desenhados contendo, quando necessário, locais reconhecimento de enzimas de restrição ou possuindo alterações na sequência de acordo com a mutação a introduzir nas sequências de DNA alvo. Os locais de reconhecimento de enzimas de restrição possibilitam a hidrólise dos fragmentos amplificados, ficando assim as suas extremidades adequadas para serem novamente religados aos DNAs dos vectores de clonagem hidrolisados com os mesmo enzimas.

III.5.2 Análise de DNA por electroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram analisados por electroforese em géis de agarose de 1 a 1,5% (m/v), de acordo com a dimensão dos fragmentos a observar, de modo a confirmar se o tamanho da banda correspondente ao produto de amplificação era o esperado. Os géis de agarose foram preparados em tampão de electroforese TAE 1x (Tris 40mM, EDTA 1mM, pH 8,3) com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou GreenSafe 0,0025%. Antes da aplicação das amostras no gel foi adicionado tampão de amostra às mesmas: Ficoll 400 2,5% (m/v), EDTA 16mM pH 8,0, Azul de bromofenol 0,2% (m/v) em TAE 1X. A electroforese decorreu em tampão de electroforese TAE 1x, sendo a voltagem utilizada sempre cerca de 6 Volt/cm. Sempre que necessário foi utilizado um marcador de massa molecular de DNA, o NZYLadder III, para confirmar o tamanho dos fragmentos analisados.

As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA de interesse foram cortadas a partir dos géis de agarose e seguidamente purificadas utilizando os kits de extracção de DNA de gel, Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit e NZYGelpure, de acordo com as instruções dos fabricantes.

III.5.3 Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição

Os produtos de PCR resultantes foram digeridos com os enzimas de restrição apropriados para cada clonagem, cortando as extremidades dos fragmentos de DNA de interesse, de forma a estes poderem ser inseridos num vector de expressão. O vector de expressão foi hidrolisado com os mesmos enzimas de restrição utilizados na preparação dos fragmentos de DNA a clonar. Cada reacção tinha um volume total de 50 µL, cada uma com 1 µL de cada enzima e tampão de reacção 1x, recomendado pelo fabricante para os enzimas escolhidos. As digestões foram efectuadas durante 2 horas a 37°C.

III.5.4 Ligação do fragmento de DNA ao vector de expressão

Para ligar os fragmentos de DNA de interesse ao vector utilizaram-se usualmente 40 ng de vector e 120 ng de fragmento, tendo em conta um tamanho médio dos produtos de PCR de 1500 nucleótidos, em reacções de 10 µL. A ligação dos fragmentos ao vector foi feita com o enzima ligase de DNA do fago T4, de acordo com as instruções do fabricante. As reacções foram normalmente incubadas a 4°C durante a noite.

III.5.5 Transformação de células competentes

Em cada reacção de transformação foram utilizados 100 µL de células competentes, às quais se juntou o DNA plasmídico (~400 ng) ou as reacções de ligação (10 µL), procedendo-se de seguida a uma incubação em gelo durante 20 minutos. Após este período as células foram submetidas a um choque térmico, sendo incubadas a 42°C durante 90 segundos e de seguida

durante 2 minutos em gelo. Seguidamente adicionou-se 600 μL de meio líquido LB sem antibiótico e incubou-se durante 1 hora a 37°C com agitação. No final da incubação as células foram centrifugadas durante 1 minuto a 7000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento celular foi ressuspenso no meio restante e plaqueado em caixas de Petri com meio LB sólido suplementado com antibiótico para o qual o vector possui um marcador de resistência, de modo a seleccionar-se os recombinantes.

III.5.6 Protocolo de *Cracking*

Após a obtenção de colónias de bactérias recombinantes, algumas foram seleccionadas de forma a confirmar a existência de clones positivos. Para tal foi utilizado o método de *cracking*, que consiste na lise de um pouco de uma colónia em 20 μL da solução tampão de *cracking*: NaOH 50 mM, SDS 0,5% (m/v), EDTA 5mM. Assim, os lisados obtidos foram incubados durante 30 minutos a 55°C e, após este tempo, foram levados ao vortéx, durante 1 minuto à velocidade máxima, para se quebrar o DNA genómico. No final, foi adicionado a cada lisado um volume apropriado de solução tampão de amostra e estes foram analisados em gel de agarose 1%. Como controlo foi utilizado o vector vazio. A inserção de um fragmento no vector aumenta a sua massa molecular, o que se irá traduzir por uma retardação da migração face ao vector de clonagem sem qualquer inserção. Assim, foi possível avaliar quais os clones positivos, por diferenças na migração dos DNAs plasmídicos provenientes das colónias lisadas relativamente ao vector vazio.

III.5.7 Produção de DNA plasmídico em pequena escala

Para a produção de DNA plasmídico em pequena escala foram escolhidas as colónias que correspondiam aos clones positivos detectados anteriormente pelo método de *cracking*. Assim, foram lançadas pequenas culturas, cada uma proveniente da inoculação de uma única colónia, em meio LB líquido (3 a 5 mL), suplementado com o antibiótico adequado, que cresceram durante a noite a 37°C com agitação. No dia seguinte as culturas foram centrifugadas e os sedimentos celulares recolhidos. A extracção do DNA plasmídico foi feita

usando o kit de extração de DNA, ZR Plasmid Miniprep™-Classic, de acordo com as instruções do fabricante.

Sempre que necessário para verificar a qualidade do DNA purificado e visualizar o fragmento inserido, procedeu-se à hidrólise do DNA plasmídico com os enzimas de restrição adequados e visualizado por electroforese em gel de agarose.

III.5.8 Sequenciação automática de DNA

De modo a determinar as sequências nucleotídicas dos clones positivos seleccionados anteriormente, estes foram analisados por sequenciação automática para garantir que as sequências clonadas foram inseridas correctamente e que não tinham sido introduzidos erros no processo de amplificação.

Cada reacção de sequenciação tinha cerca de 500 ng do DNA molde e 30 pmol do *primer* específico. As reacções de sequenciação foram feitas por PCR: 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C durante 25 ciclos. De seguida, o DNA foi precipitado com 1/5 do volume inicial de acetato de sódio (CH₃COONa) 3M e 5 volumes de etanol 95%, incubando 30 minutos à temperatura ambiente. Os produtos de precipitação foram centrifugados a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se etanol 70% ao sedimento de DNA e voltou-se a centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. No final, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento de DNA foi deixado a secar ao ar. A análise dos sedimentos foi feita pelo serviço de sequenciação do Instituto Gulbenkian de Ciência.

As sequências nucleotídicas resultantes do processo de sequenciação foram analisadas com a ajuda do *software Chromas Lite*.

III.5.9 Produção de DNA plasmídico em grande escala

Os plasmídeos recombinantes cuja sequenciação confirmou a qualidade da sequência nucleotídica foram preparados em grande escala. Para isso, foram lançadas culturas, a partir do DNA plasmídico transformado em células competentes ou a partir da inoculação de uma

única colônia correspondente ao plasmídeo recombinante sequenciado, em meio LB líquido (200 mL), suplementado com o antibiótico adequado. As culturas cresceram durante a noite a 37°C com agitação e o DNA plasmídico foi extraído com os kits Plasmid Midi Kit e NZYMidiprep.

III.6 Mutagênese dirigida

Para introduzir mutações pontuais na sequência codificante do TBCCD1 recorreu-se à técnica de mutagênese dirigida, mais especificamente à técnica *Overlap Extension PCR*. Para tal, foi desenhado um par de *primers* (quadro III.1.) para cada mutação, ambos com a alteração nucleotídica desejada, permitindo assim amplificar por PCR o fragmento com o nucleótido alterado desejado.

Quadro III.1. Sequências dos *primers* utilizados na clonagem das sequências codificantes da proteína TBCCD1 com mutações pontuais que conduzem ao aparecimento de um novo resíduo de aminoácido (As sequências sublinhadas correspondem às alterações nucleotídicas)

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
TBCCD1 <i>Forward</i> P24A	5'-CCTGCAGGTCCCC <u>G</u> CTCCATCCAAGTTT-3'
TBCCD1 <i>Reverse</i> P24A	5'-AAACTTGGATGGAG <u>C</u> GGGGACCTGCAAGG-3'
TBCCD1 <i>Forward</i> K292E	5'-CAAGTTGAAGGGACCACC <u>G</u> AAAAGAGCTAAGATTGCTT-3'
TBCCD1 <i>Reverse</i> K292E	5'-AAGCAATCTTAGCTCTTT <u>C</u> GGTGGTCCCTTCAACTG-3'
TBCCD1 <i>Forward</i> K295E	5'-GAAGGGACCACCAAAGAGCT <u>G</u> AGATTGCTTGTAACT-3'
TBCCD1 <i>Reverse</i> K295E	5'-AGTATTACAAGCAATCT <u>C</u> AGCTCTTTGGTGGTCCCTTC-3'
TBCCD1 <i>Forward</i> P365A	5'-CATCTTTGTCTTGGG <u>C</u> GCTGTAGGGACTACT-3'
TBCCD1 <i>Reverse</i> P365A	5'-AGTGTAGTCCCTACAG <u>C</u> GCCCAAGACAAAGATG-3'
TBCCD1 <i>Forward</i> R386C	5'-AGTCATTGCTGTTTGCCAT <u>T</u> GTTTGTCCATCTCTTCTAC-3'
TBCCD1 <i>Reverse</i> R386C	5'-GTAGAAGAGATGGACAAAC <u>A</u> ATGGCAAACAGCAATGACT-3'

III.6.1 *Overlap extension PCR*

Para cada mutação pontual a introduzir na região codificante do TBCCD1, os dois *primers* correspondentes a cada mutação (PF* e PR*, *forward* e *reverse*, respectivamente) foram utilizados na amplificação das sequências de DNA em reacções de PCR separadas (PCR 1 e PCR 2). Deste modo, realizou-se uma reacção de PCR utilizando o *primer* mutado respectivo e recorrendo aos *primers* capazes de emparelhar com as extremidades do TBCCD1 (PF e PR, *forward* e *reverse*, respectivamente) (quadro III.2.). De seguida, os dois produtos de amplificação obtidos foram purificados e quantificados. Por fim, fez-se uma terceira reacção de amplificação (PCR 3), por *Overlap extension PCR*, onde se juntaram os dois fragmentos anteriormente obtidos e purificados com os *primers* capazes de emparelhar com as extremidades do TBCCD1 (PF e PR), tendo sido usada a mesma quantidade de cada fragmento. No final, o fragmento obtido foi purificado, digerido e clonado, como descrito anteriormente (figura III.1.), correspondendo ao clone do TBCCD1 com a mutação desejada.

As reacções de amplificação por PCR foram realizadas segundo as condições descritas no quadro III.3. A construção de todos os mutantes do TBCCD1 foi feita utilizando o plasmídeo pIC111-TBCCD1 como molde. Os fragmentos obtidos foram clonados em fusão com a proteína GFP no vector de expressão pIC111, entre os locais de restrição BamHI e NotI.

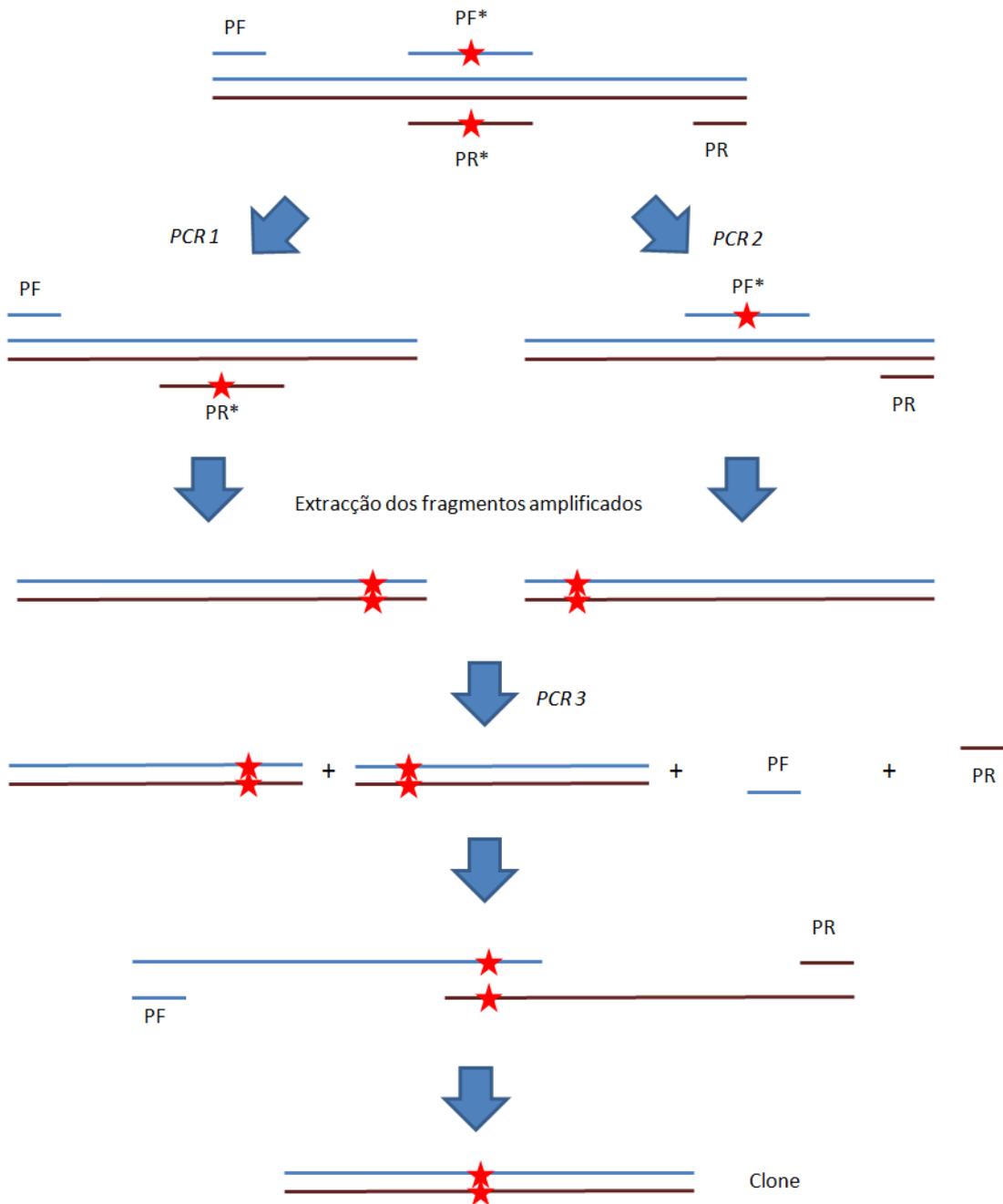


Figura III.1. *Overlap Extension PCR*. Inserção de mutações pontuais na sequência codificante do TBCCD1 através de *overlap extension PCR*. Para cada mutação, o par de *primers* com a alteração nucleotídica desejada (PF* e PR*, *forward* e *reverse* respectivamente) foi utilizado na amplificação das sequências de DNA separadamente (PCR 1 e PCR 2) em conjunto com os *primers* que emparelham nas extremidades do TBCCD1 (PF e PR, *forward* e *reverse* respectivamente). Os dois produtos de amplificação obtidos foram purificados e quantificados. Na terceira reacção de amplificação (PCR 3), por *Overlap extension PCR*, juntaram-se os dois fragmentos anteriormente obtidos com os *primers* capazes de emparelhar com as extremidades do TBCCD1 (PF e PR). No final, o fragmento obtido foi extraído e purificado, correspondendo ao clone com a mutação desejada.

Quadro III.2. Sequências dos *primers* utilizados na clonagem das sequências codificantes da proteína TBCCD1 (As sequências sublinhadas correspondem aos locais de reconhecimento dos enzimas de restrição)

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
TBCCD1 <i>Forward</i> (BamHI)	5' CGC <u>GGATCC</u> GCCTTAGAGATAATATGGATCAGTC 3'
TBCCD1 <i>Reverse</i> (NotI)	5' AAGGAAAAAAG <u>CGGCCG</u> CAGCTGCTTGTGG AGC 3'

Quadro III.3. Condições para as reacções de amplificação por PCR

<i>Iniciação</i>	<i>Desnaturação</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongação</i>	<i>Elongação final</i>
94°C	94°C	58°C	72°C	72°C
5 min	30 seg	30 seg	1 min/Kb	10 min
30 ciclos				

III.7 Clonagem de sequências codificantes da proteína TBCCD1 com deleções no N-terminal em vectores de expressão em células de mamíferos

Foram construídas formas truncadas da proteína TBCCD1 com deleções no N-terminal de 20, 131 e 230 resíduos de aminoácidos (TBCCD1 Δ 20, Δ 131 e Δ 230, respectivamente) e para tal foram desenhados *primers forward* (quadro III.4.) de forma a permitir a amplificação das sequências codificantes truncadas. Estes *primers forward* não possuem local de reconhecimento para um enzima de restrição, ficando o clone com uma extremidade cega. Para todos os clones o mesmo *primer reverse* do TBCCD1 foi utilizado (quadro III.2.). As reacções de amplificação por PCR foram realizadas segundo as condições descritas no quadro III.3. As sequências codificantes de cada clone foram amplificadas a partir do plasmídeo TBCCD1 GFP (Gonçalves, 2010) e clonadas nos locais de restrição EcoRV e NotI em fusão com a proteína GFP no vector de expressão pIC111.

Quadro III.4. Sequências dos *primers* utilizados nas clonagens das sequências codificantes da proteína TBCCD1 com deleções no N-terminal

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
TBCCD1 Δ20 <i>Forward</i>	5' ATGCAGGTCCCCCTCCA 3'
TBCCD1 Δ131 <i>Forward</i>	5' AATATGGTCTCCCTAAGGACATCTTTG 3'
TBCCD1 Δ230 <i>Forward</i>	5' AATATGGAACCTTGCACTGTGGCA 3'

III.8 Clonagem da sequência codificante dos 20 primeiros aminoácidos do N-terminal da proteína TBCCD1 em vectores de expressão em células de mamíferos

O fragmento correspondente à sequência codificante dos primeiros 20 aminoácidos do N-terminal da proteína TBCCD1 foi clonado no vector pIC111. Para a amplificação do fragmento foi desenhado um *primer reverse* específico (quadro III.5.) sem local de reconhecimento para um enzima de restrição, ficando a extremidade cega, e foi utilizado o *primer forward* do TBCCD1 (quadro III.2.). A reacção de amplificação por PCR foi realizada segundo as condições descritas no quadro III.3. A sequência codificante deste fragmento foi amplificada a partir do plasmídeo pIC111-TBCCD1 e o fragmento obtido foi inserido nos locais BamHI e EcoRV do vector pIC111.

Quadro III.5. Sequência do *primer* utilizado na clonagem da sequência codificante dos 20 primeiros aminoácidos do N-terminal da proteína TBCCD1.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
TBCCD1 20aa <i>Reverse</i>	5' CAAGGCACCCACTATAAAGG 3'

III.9 Clonagem da sequência codificante da proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* em vectores de expressão em células de mamíferos

A sequência codificante da proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* (AT3G57890) foi amplificada a partir de *primers* desenhados (quadro III.6.), cada um com um local de reconhecimento para um enzima de restrição, de modo a possibilitar a hidrólise das extremidades dos fragmentos obtidos e a posterior inserção dirigida num vector. A reacção de amplificação por PCR foi realizada segundo as condições descritas no quadro III.3. A sequência codificante deste fragmento foi amplificada a partir do plasmídeo pIC111-TBCCD1 e o fragmento obtido foi então clonado no vector pIC111, entre os locais EcoRV e NotI.

Quadro III.6. Sequência dos *primers* utilizados na clonagem da sequência codificante da proteína TBCCD1 de *Arabidopsis Thaliana* (AT3G57890) (As sequências sublinhadas correspondem aos locais de reconhecimento dos enzimas de restrição)

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
TBCCD1 At <i>Forward</i> (EcoRV)	5' <u>GATATCATGACGGAAGAGCTCATCG</u> 3'
TBCCD1 At <i>Reverse</i> (NotI)	5'AAGGAAAAAAG <u>CGGCCGC</u> CATCGCCTTGTAGGCAGTAAAG 3'

III.10 Clonagem da sequência codificante da proteína TBCCD1 com os domínios CARP e TBCC deletados em vectores de expressão em células de mamíferos

Foi construído um clone da proteína TBCCD1 que não possui parte da C-terminal, incluindo os dois domínios funcionais CARP e TBCC. Para amplificar o fragmento pretendido foi desenhado um *primer reverse* (quadro III.7.), sem um local de reconhecimento para um enzima de restrição, ficando a extremidade cega, e foi utilizado o *primer forward* do TBCCD1 completo (quadro III.2.). As reacções de amplificação por PCR foram realizadas segundo as condições descritas no quadro III.3, à excepção do número de ciclos, que foram 35 e da temperatura de *annealing*, que foi 49°C em vez de 58°C. A sequência codificante deste fragmento foi amplificada a partir do plasmídeo pIC111-TBCCD1 e o fragmento obtido foi inserido entre os locais BamHI e EcoRV do vector pIC111.

Quadro III.7. Sequência do primer utilizado na clonagem da sequência codificante da proteína TBCCD1 sem os domínios funcionais CARP e TBCC.

<i>Primer</i>	<i>Sequências</i>
TBCCD1 <i>Reverse</i> Δ CARP+TBCC	5' ACGATGAATCTTTACATG 3'

III.11 Otimização da transfecção de células de mamífero com DNA plasmídico

De modo conseguir uma boa eficiência de transfecção de células de mamífero foi feita uma otimização da transfecção, inicialmente em células HEK 293T, em que foi necessário determinar qual a melhor relação entre a quantidade de DNA plasmídico e de reagente de lipofecção Lipofectamine 2000. Para as transfecções as células HEK 293T foram semeadas em placas de 6 poços e a uma densidade de 3×10^5 por poço, cerca de 18h antes da transfecção. Diversas quantidades de Lipofectamine 2000 e DNA plasmídico foram utilizadas para determinar qual a combinação que resultaria na melhor eficiência de transfecção (quadro III.8.). Sempre que necessário, as células foram semeadas sobre lamelas de vidro revestidas com Poli-L-Lisina. O DNA plasmídico utilizada foi o TBCCD1-GFP.

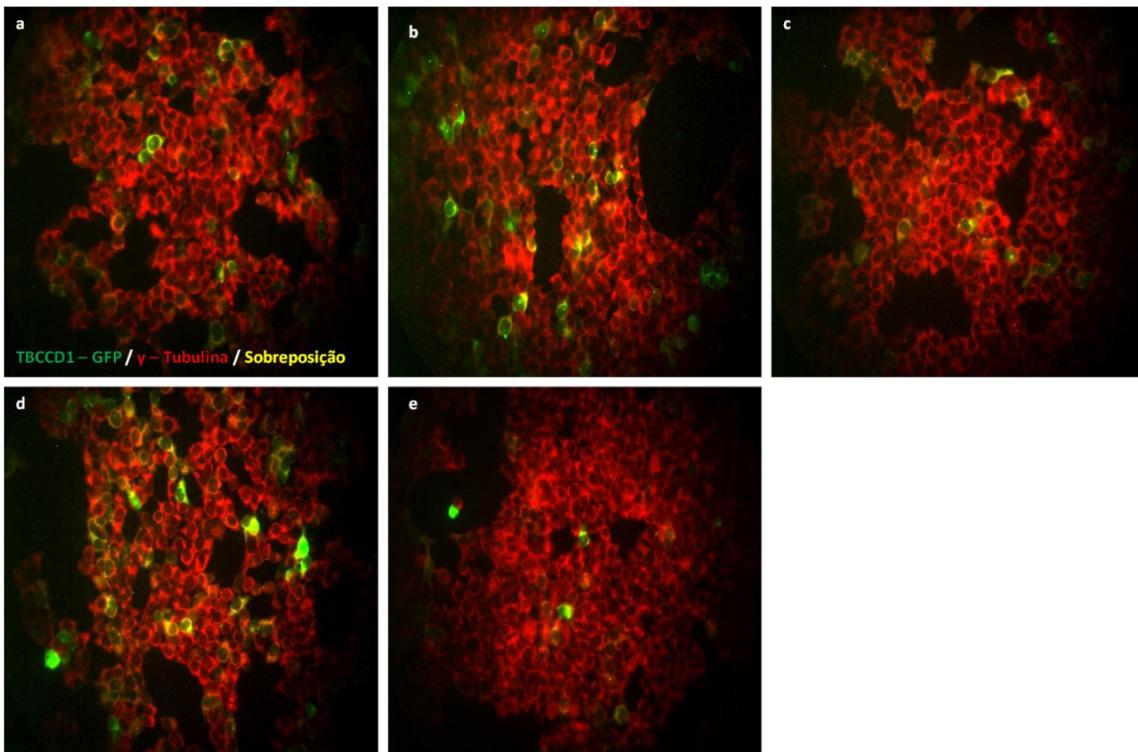
Quadro III.8. Combinações de quantidades de DNA plasmídico e Lipofectamine 2000 utilizadas na otimização da transfecção de células de mamíferos

Combinação	DNA plasmídico (µg)	Lipofectamine 2000 (µL)
1	3	4
2	5	2
3	1,5	2
4	1,5	4
5	0,5	1,5

Inicialmente, a Lipofectamine 2000 foi diluída em Optimem e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Durante os 5 minutos de incubação, o DNA plasmídico foi também diluído em Optimem. De seguida, juntou-se o DNA plasmídico à Lipofectamine 2000 e a

mistura foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente, de modo a formar os complexos DNA : agente lipídico. Neste período o meio de cultura das células foi substituído por meio de cultura sem soro, uma vez que o soro inibe o processo de lipofecção, e por fim a mistura DNA : agente lipídico foi adicionada às células. Passadas 2,5 horas de incubação a 37°C, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura suplementado com soro de modo a parar o processo de transfecção. As células transfectadas foram analisadas 24h depois.

A - HEK 293T



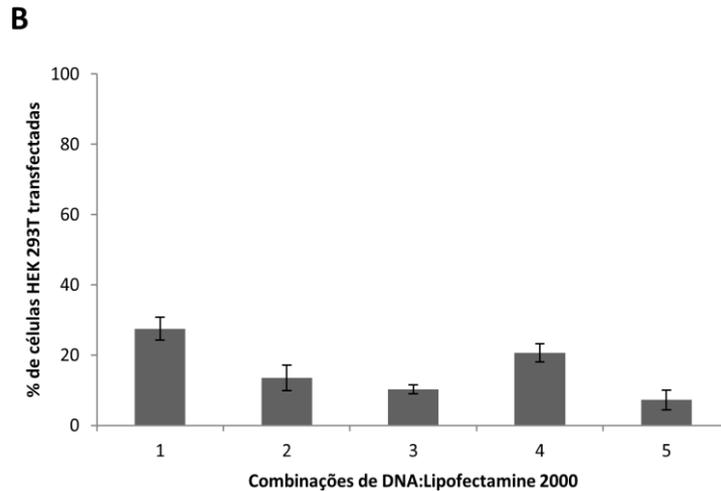


Figura III.2. Otimização da transfecção de células HEK 293T com a proteína TBCCD1-GFP. (A) Células HEK 293T transfectadas com as combinações DNA:Lipofectamine 2000 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) e 5 (e) do quadro III.8. As combinações com melhor eficiência de transfecção foram a 1 e a 4. **(B)** Representação gráfica da percentagem (\pm desvio padrão) de células HEK 293T transfectadas com a TBCCD1-GFP. O valor obtidos correspondem a uma única experiência independentes para cada combinação DNA:Lipofectamine 2000. As barras de escala correspondem a 50 μ m.

Dado os resultados obtidos para as células HEK 293T, foram escolhidas as melhores condições para testar nas células HeLa e otimizar o processo de transfecção nestas células, que correspondem às combinações do quadro III.8. DNA:Lipofectamine 2000 1, 2 e 4 com eficiência de transfecção de 27,5%, 13,5% e 20,6%, respectivamente (figura III.2). Desta forma as células HeLa foram semeadas em placas de 6 poços, a uma densidade de 3×10^5 por poço e foram testadas as combinações 1, 2 e 4 (quadro III.8.). Sempre que necessário, as células foram semeadas sobre lamelas de vidro revestidas com Poli-L-Lisina. O procedimento experimental para a transfecção nestas células foi idêntico ao realizado para as células HEK 293T, descrito anteriormente.

A - HeLa

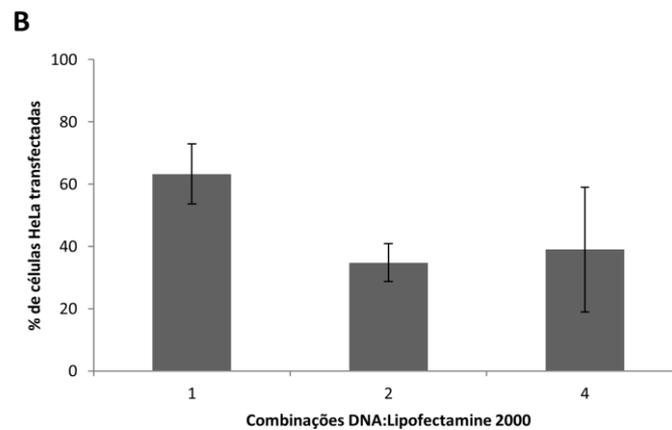
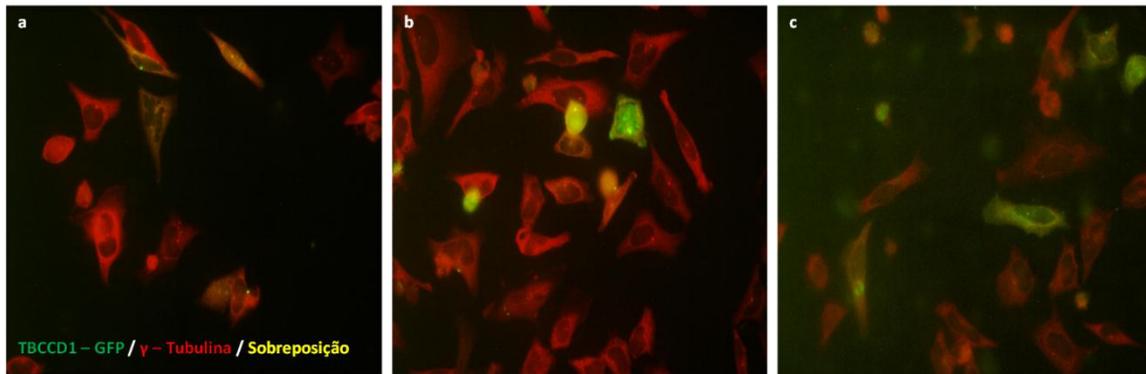


Figura III.3. Otimização da transfecção de células HeLa com a proteína TBCCD1-GFP. (A) Células HeLa transfectadas com as combinações DNA:Lipofectamine 2000 1 (a), 2 (b), e 4 (c). As combinações com melhor eficiência de transfecção foram a 1 e a 4. **(B)** Representação gráfica da percentagem (\pm desvio padrão) de células HeLa transfectadas com a TBCCD1-GFP. O valor obtidos correspondem a uma única experiência independentes para cada combinação DNA:Lipofectamine 2000. As barras de escala correspondem a 10 μ m.

Com os resultados obtidos na otimização do processo de transfecção nas células HeLa verificou-se que as melhores condições nestas células correspondem às combinações DNA:Lipofectamine 2000 1 e 4 com eficiência de transfecção de 63,2% e 39%, respectivamente (figura III.3). Assim, sempre que se realizaram transfecções de DNA plasmídico optou-se por escolher a combinação DNA:lipofectamine 2000 1, tanto para as células HEK 293T como para as células HeLa.

Sempre que se pretendeu obter camadas confluentes de células HEK 293T para se induzir a produção de cílios as condições de transfecção tiveram que ser alteradas. Assim, as células

foram semeadas em placas de 6 poços, cerca de 18h antes da transfecção e a uma densidade de 3×10^5 por poço. No dia seguinte, as células foram transfectadas com as quantidades de lipofectamine 2000 e de DNA referentes à combinação 1 do quadro III.8.. Após a paragem da transfecção, as células foram incubadas em meio completo durante cerca de 3/4 horas para permitir a expressão do plasmídeo. De seguida, o meio foi substituído por meio sem soro e as células ficaram nestas condições durante 48h. No final deste período as células foram analisadas por imunofluorescência.

III.12 Microscopia de Imunofluorescência

Para a realização da técnica de microscopia de imunofluorescência as células HEK 293T, RPE-1 e HeLa foram cultivadas aderentes a lamelas de vidro em placas de 6 poços.

O meio de cultura foi aspirado e as células aderentes às lamelas foram lavadas com PBS. As células foram fixadas e permeabilizadas com metanol 100% previamente gelado durante 10 minutos a -20°C . De um modo geral o método usado foi a fixação com metanol. No entanto, quando as células foram coradas com o corante faloidina foram fixadas com uma solução 3,7% de paraformaldeído durante 10 minutos à temperatura ambiente e de seguida permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 0,1% em PBS durante 2 minutos à temperatura ambiente. Depois da fixação e permeabilização, independente do método, as células foram lavadas duas vezes com PBS, durante 5 minutos, e uma vez com PBS-Tween 0,1% (v/v). Posteriormente procedeu-se ao bloqueio das células com uma solução de BSA 3% (m/v) em PBS, durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, fez-se a incubação com o anticorpo primário (quadro III.9.) ou o corante faloidina (1:200) diluídos em solução de bloqueio (40 μL) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, durante 5 minutos, e uma vez com PBS-Tween 0,1% (v/v). Seguidamente efectuou-se a incubação com o anticorpo secundário (ver quadro III.9. para títulos utilizados) diluído em solução de bloqueio (40 μL) e nas mesmas condições que a incubação com o anticorpo primário. As células foram depois lavadas como descrito anteriormente. Por último, foi feita a marcação do DNA por incubação de 40 μL de uma solução de DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em água, durante 1 minuto à temperatura ambiente, seguida de duas lavagens com PBS, uma rápida e outra de 10 minutos.

As lamelas foram montadas em lâminas de vidro, sobre uma gota de meio de montagem MOWIOL 4-88 suplementado com 2,5% (m/v) de DABCO.

As células foram observadas num microscópio de fluorescência Leica DMRA2 ou num Sistema Deltavision. Todas as imagens obtidas são resultado de projecções em Z, de modo a possuir *stacks* que contemplassem as células todas para não falhar o centróssoma. O processamento das imagens obtidas por microscopia de fluorescência foi efectuado no software *Image J*.

Quadro III.9. Anticorpos primários e secundários e respectivas diluições usadas na análise de microscopia de imunofluorescência

	Animal em que foi produzido	Diluição
Anticorpo Primário		
Anti- γ -tubulina (Sigma, clone T6557)	Murganho	1:200
Anti-tubulina poliglutamilada (GT335)	Murganho	1:100
Anticorpo Secundário		
Anti-murganho Alexa 594 (Molecular Probes)	Cabra	1:500

III.13 Análise estatística

Para o tratamento estatístico a comparação de resultados entre dois grupos distintos foi realizada através do teste t de *Student* bilateral, assumindo variâncias iguais entre os grupos. Considerou-se um resultado estatisticamente significativo sempre que o valor de $p < 0,05$.

IV – Resultados

IV.1 Estudo dos domínios da proteína TBCCD1 humana na sua localização celular

A proteína TBCCD1 humana é uma proteína centrossomal que foi identificada e descrita recentemente, sendo que o seu estudo ainda se encontra no início. Como referido anteriormente, o TBCCD1 localiza-se no centrossoma durante a interfase e durante a divisão celular parece ser transportada através dos microtúbulos para a zona mediana do fuso mitótico na anafase e posteriormente para o corpo médio na citocinese (Gonçalves, 2010). O domínio do TBCCD1 que determina a localização centrossomal encontra-se na sua região N-terminal (1-328aa), uma vez que quando se dividiu a proteína ao meio e cada região, N- e C-terminal, foi expressa em fusão com a proteína fluorescente GFP, apenas a região N-terminal se apresentou no centrossoma (Gonçalves et al., 2010a) (figura I.15.).

Assim, a primeira parte do presente trabalho teve como objectivo principal determinar qual o domínio mínimo da região N-terminal da proteína TBCCD1 humana que é responsável pela sua localização centrossomal. Para tal, criaram-se e caracterizaram-se proteínas com deleções na sua extremidade N-terminal em fusão com a GFP em linhas celulares humanas.

IV.1.1 Análise da sequência de resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 humana

Tendo em conta que se pretende determinar qual o domínio dentro da região N-terminal responsável pela localização centrossomal do TBCCD1, começou por se analisar a sequência de resíduos de aminoácidos da proteína humana de modo a poder identificar locais que possam ter um potencial interesse nesta função.

Assim, primeiramente, foi feita uma análise do perfil de hidropatia da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína humana (figura IV.1.), que mostrou que existem regiões hidrófobas ao longo da proteína, sendo que estas regiões correspondem às zonas no gráfico

com valores superiores a 0. Em particular, dentro da região N-terminal, os primeiros 20 resíduos de aminoácidos do TBCCD1 correspondem a um domínio hidrófobo, que poderia promover uma ligação directa ou indirecta desta proteína, por exemplo, a membranas. Como o TBCCD1 está envolvido na ligação do núcleo ao centrossoma por um mecanismo desconhecido, pareceu-nos importante esta característica pois a referida ligação poderia envolver interações com a membrana nuclear.

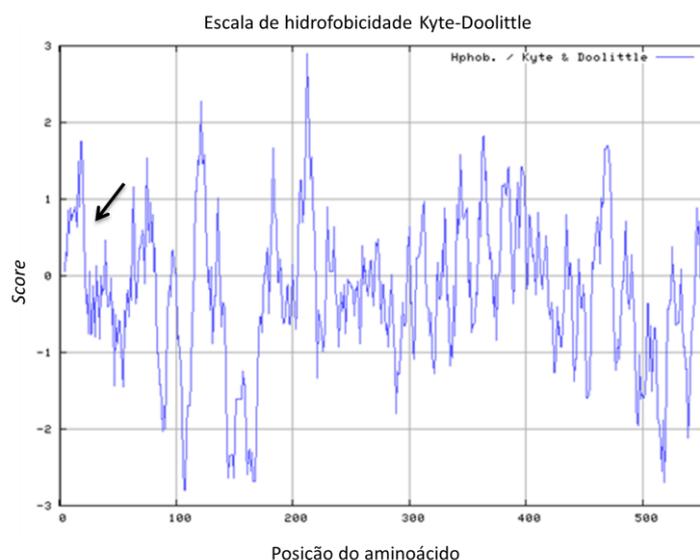


Figura IV.1. Perfil de hidrofobicidade da proteína TBCCD1. O perfil de hidrofobicidade da proteína TBCCD1 humana foi obtido usando a ferramenta presente no site <http://web.expasy.org/protscale/>, seleccionando o algoritmo de determinação de hidrofobicidade de Kyte-Doolittle. Este algoritmo determina que regiões com valores acima de 0 têm um perfil hidrófobo. Os valores apresentados indicam a previsão de uma região hidrófoba nos primeiros 20 resíduos de aminoácidos do TBCCD1 (seta preta).

Foi também realizada uma análise da sequência primária do TBCCD1 humano de forma a determinar a existência de um eventual péptido sinal e de locais de clivagem no mesmo (figura IV.2.). Um péptido sinal é uma sequência que possui entre 15 e 60 aminoácidos geralmente localizada na região N-terminal das proteínas. Várias proteínas sintetizadas nos compartimentos celulares não desempenham os seus papéis biológicos onde são sintetizadas, necessitando ser transportadas para o local onde exercerão as suas funções. O péptido sinal tem como função dirigir as proteínas que serão transportadas para esses locais. Estas proteínas serão então reconhecidas por meio do péptido sinal, o qual, após a exportação, pode

ser removido da proteína por clivagem proteolítica ou pode manter-se como parte integrante da proteína (Bendtsen et al., 2004). Assim, verificou-se a existência de um local de clivagem proteolítica putativo entre as posições 19 e 20 do TBCCD1, podendo este facto também indicar a existência de duas formas hipotéticas da proteína.

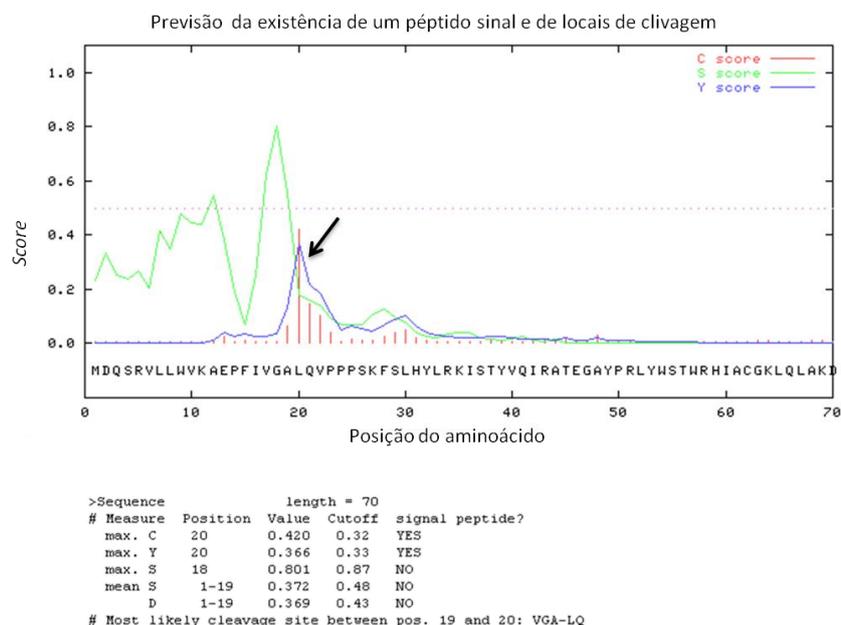


Figura IV.2. Previsão da presença de péptido sinal na proteína TBCCD1. A análise da previsão de péptido sinal foi obtida através da ferramenta SignalP 3.0 Server presente no site <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. Os valores apresentados resultam da probabilidade de existência de um péptido sinal e da previsão da existência de locais de clivagem. O *score* Y é o valor que representa a melhor previsão da posição de um local de clivagem (Bendtsen et al., 2004). A partir desta análise foi previsto um local de clivagem entre as posições 19 e 20 da proteína TBCCD1 (seta preta).

Assim, analisando os resultados obtidos é possível prever que a sequência dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos do TBCCD1 possa ter uma função importante relacionada com a localização centrossomal da proteína e ser um motivo conservado entre os TBCCD1 das várias espécies. Desta forma, a sequência dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína serão alvo de especial atenção neste estudo. No entanto, toda a região N-terminal foi avaliada da mesma forma.

IV.1.2 Determinação do domínio mínimo crítico para a localização centrossomal da proteína TBCCD1 humana

Para se estudar a região N-terminal da proteína TBCCD1, nomeadamente para se determinar qual o domínio mínimo responsável pela localização da proteína no centrossoma, foram construídas três formas truncadas da proteína com deleções no N-terminal referente aos primeiros 20, 131 e 230 resíduos de aminoácidos (TBCCD1 Δ 20, Δ 131 e Δ 230, respectivamente) (figura IV.3.). Os critérios para a escolha das deleções a fazer basearam-se, em primeiro lugar, nos resultados obtidos para o perfil de hidrofobicidade e de péptido sinal anteriormente apresentados, resultado na criação de um clone sem os primeiros 20 resíduos de aminoácidos. Os outros dois clones com deleções de 131 e 230 resíduos aminoácidos surgiram da divisão do N-terminal em três partes.

Para além disso, existe um possível domínio *coiled coil* de proteína STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) entre os resíduos de aminoácido 28-129 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?g=ENSG00000113838;r=3:186264128-186285141;t=ENST00000338733), que desta forma ficou presente no clone TBCCD1 Δ 131 e ausente no clone TBCCD1 Δ 230 (figura IV.3.). As sequências codificantes do gene do TBCCD1 humano com deleções no N-terminal foram clonadas em vectores de expressão de mamífero em fusão com a proteína fluorescente GFP no C-terminal. O DNA dos plasmídeos recombinantes foi purificado para transfectar células de mamífero de modo a estas expressarem as proteínas de fusão e assim estudar a sua localização na célula. Assim, as formas deletadas do TBCCD1 sobreexpressas vão competir com a proteína TBCCD1 endógena, podendo substituí-la nos locais onde é encontrada, podendo revelar desta forma o papel funcional das regiões deletadas e da própria proteína TBCCD1.

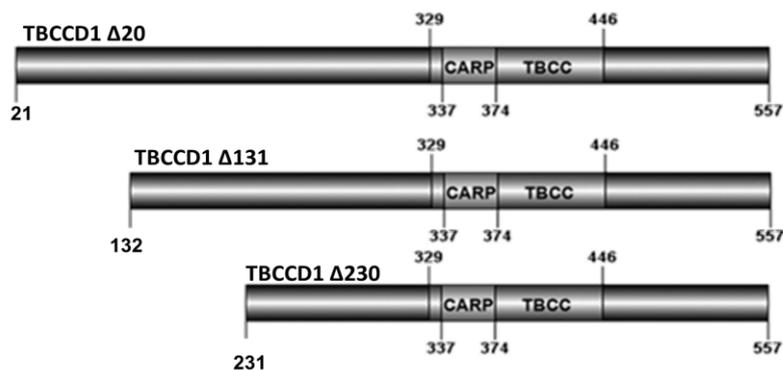
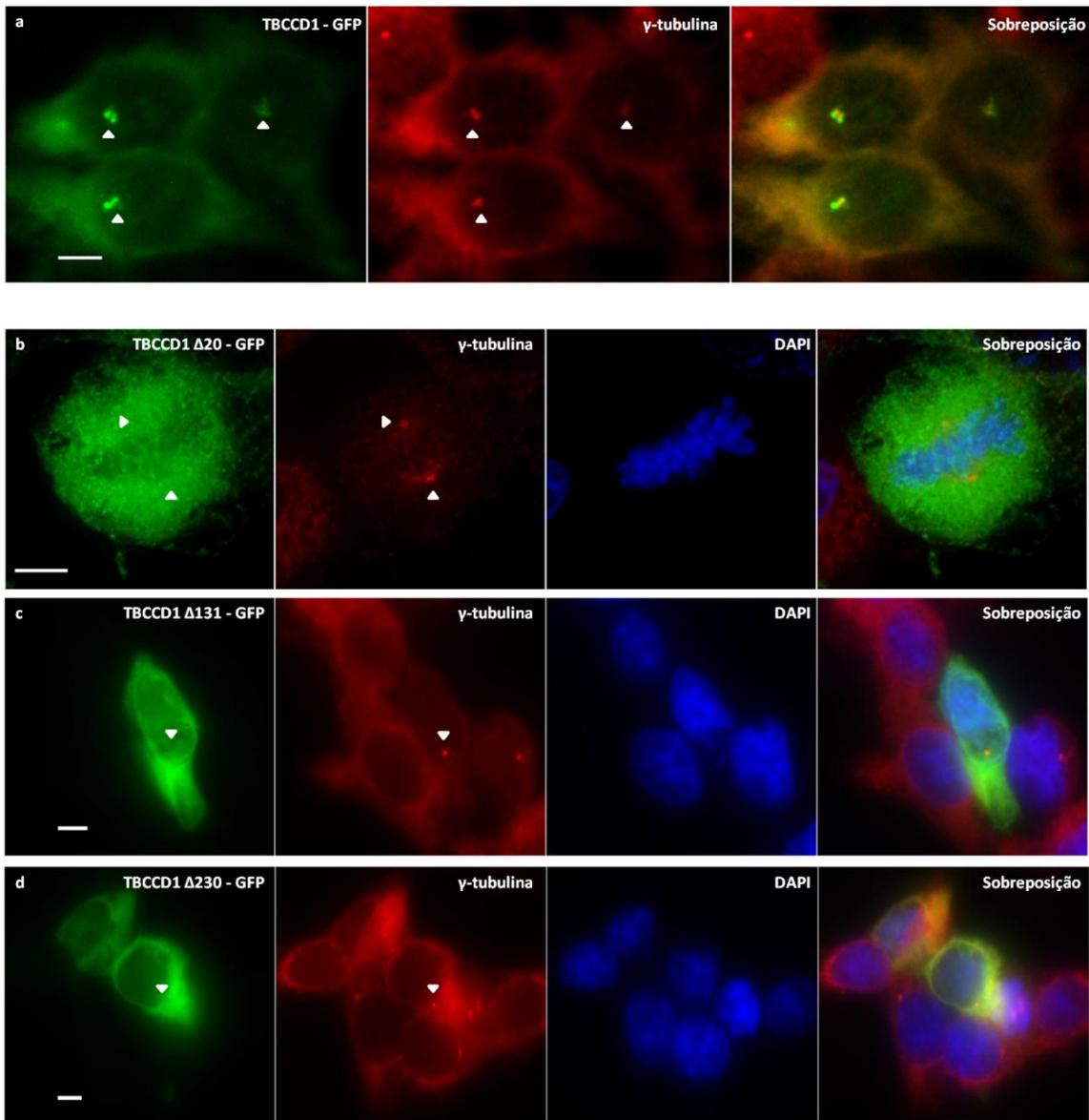


Figura IV.3. Formas truncadas da proteína TBCCD1 humana com deleções no N-terminal. Representação esquemática das três diferentes formas da proteína TBCCD1 humana com deleções no N-terminal: TBCCD1 Δ20, TBCCD1 Δ131 e TBCCD1 Δ230, onde são evidenciados os domínios funcionais CARP e TBCC. O domínio *coiled-coil* está presente nos clones TBCCD1 Δ20 e TBCCD1 Δ131, encontrando-se ausente no clone TBCCD1 Δ230.

Através desta análise, efectuada em células HEK 293T e HeLa, observou-se que nenhuma das três proteínas de fusão se localizava no centróssoma (figura IV.4. Ab,c,d e Bb,c,d), uma vez que não se verificou acumulação de nenhuma das proteínas TBCCD1-GFP deletadas neste organelo, ao contrário do que acontece no controlo com a proteína de fusão TBCCD1-GFP sem qualquer modificação (figura IV.4. Aa e Ba). No entanto, as três proteínas de fusão encontravam-se localizadas difusamente no citoplasma (figura IV.4. Ab,c,d e Bb,c,d). O facto de nenhuma das três proteínas com diferentes deleções no N-terminal, inclusive aquela que apresentava a deleção mais pequena, se encontrar no centróssoma, sugere que a sequência correspondente aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 é de extrema importância para determinar a localização centróssomal da proteína. Assim, conclui-se que pelo menos os primeiros 20 resíduos de aminoácidos correspondem ao domínio mínimo da região N-terminal que determina a localização da proteína TBCCD1 no centróssoma, uma vez que a proteína que apresenta uma deleção deste domínio já não se encontra localizada no mesmo organelo.

A- HEK 293T



B - HeLa

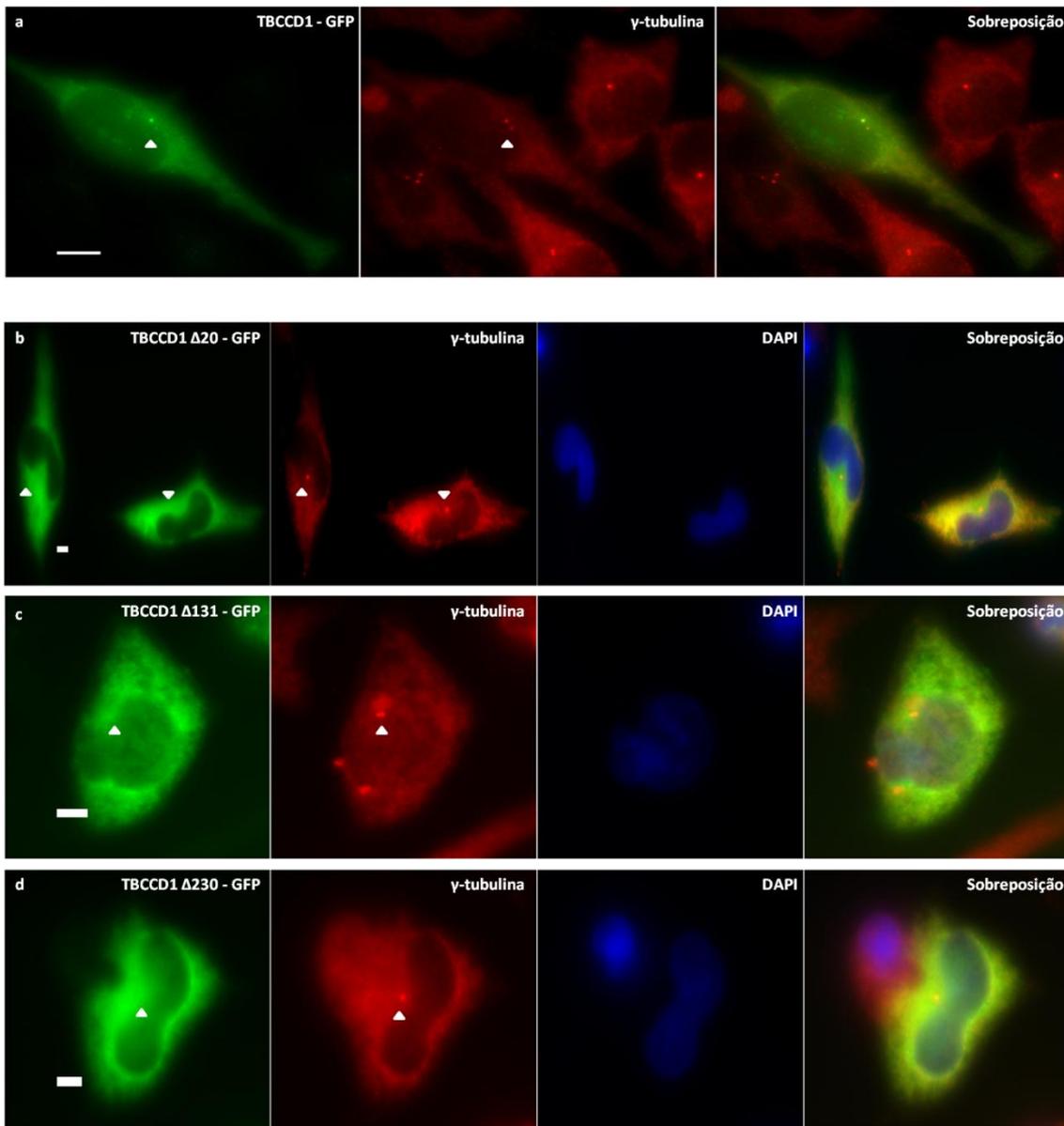


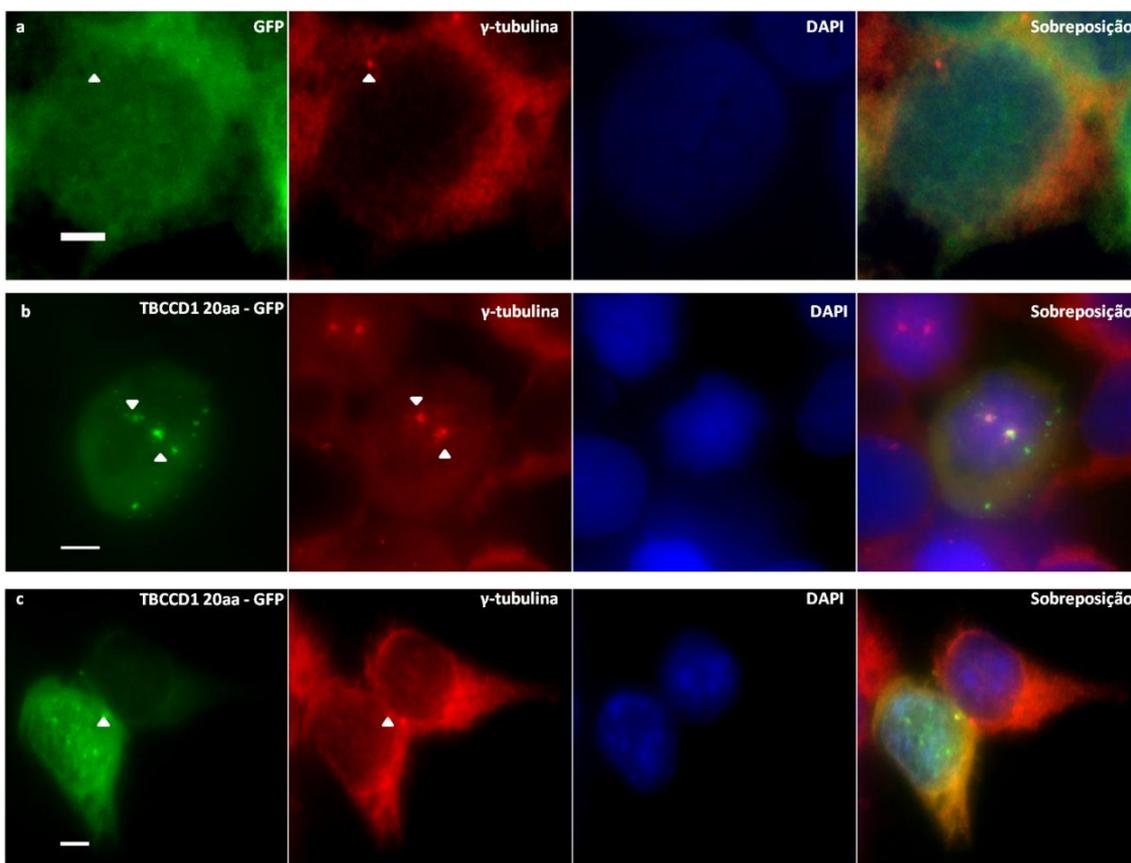
Figura IV.4. Determinação do domínio mínimo responsável pela localização centrossomal da proteína TBCCD1 humana através da expressão de proteínas TBCCD1-GFP deletadas na região N-terminal. (A) Células HEK 293T a expressar as proteínas TBCCD1, TBCCD1 Δ 20, TBCCD1 Δ 131 e TBCCD1 Δ 230 (**a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente) em fusão com GFP foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. (**Ab**) Célula em mitose; (**Aa**, **c** e **d**) Células em interfase. Os resultados apresentados são representativos de um total de uma experiência independente para a proteína TBCCD1-GFP e duas para as restantes proteínas. (**B**) Células HeLa a expressar os plasmídeos TBCCD1, TBCCD1 Δ 20, TBCCD1 Δ 131 e TBCCD1 Δ 230 (**a**, **b**, **c** e **d**, respectivamente) em fusão com GFP foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. (**Ba-d**) Células em interfase. Estes resultados são representativos de duas experiências independentes para a proteína TBCCD1 Δ 20-GFP e uma única experiência para as proteínas TBCCD1 Δ 131-GFP, TBCCD1 Δ 230-GFP e TBCCD1-GFP. Em **Aa** e **Ba** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina e para a proteína de

fusão nos centrosomas. Em **Ab,c,d** e **Bb,c,d** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína de fusão nesta estrutura. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

IV.1.3 Análise da localização do domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 humana

Com os dados obtidos anteriormente procurou-se perceber se o péptido isolado correspondente aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1, seria capaz de se localizar por si só no centróssoma. Para isso a sequência codificante do gene do TBCCD1 correspondente aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína foi clonada num vector de expressão de mamífero em fusão com a proteína fluorescente GFP no C-terminal. O plasmídeo recombinante foi utilizado para transfectar células HEK 293T e HeLa, de modo a estas expressarem a proteína de fusão e assim estudar a sua localização na célula bem como os efeitos no centróssoma (figura IV.5.).

A - HEK 293T



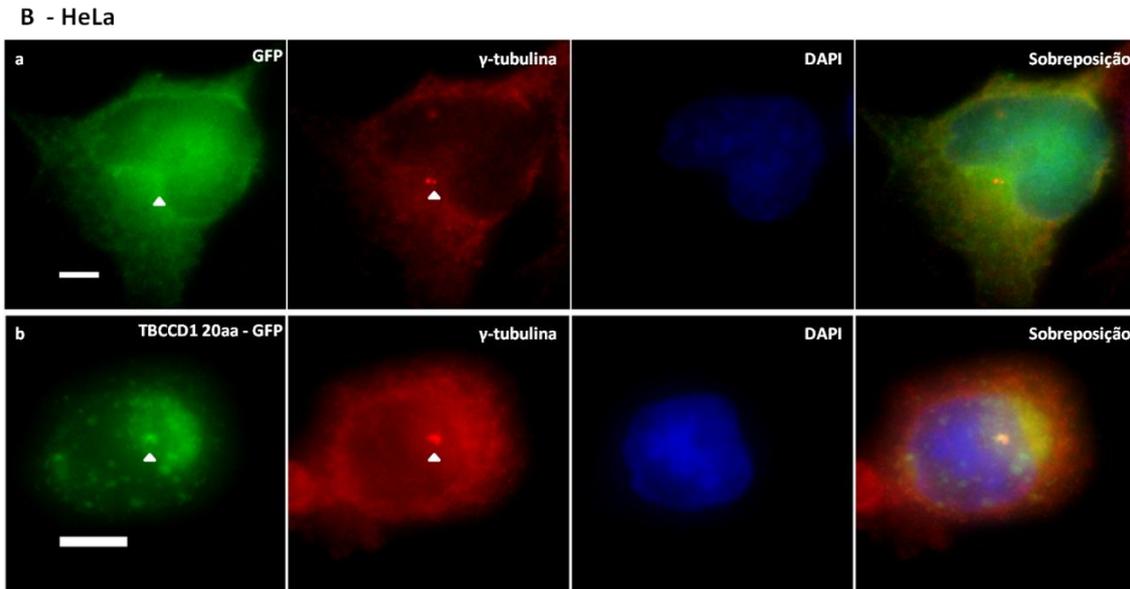


Figura IV.5. Análise da localização do domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 humana através da expressão deste péptido em fusão com a proteína GFP. (A) Células HEK 293T foram transfectadas com a proteína GFP (**a**) e com a proteína TBCCD1 20aa em fusão com GFP (**b** e **c**) e processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em **a** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência de GFP nesta estrutura. Em **b** e **c** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 20aa e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados são representativos de um total de três experiências independentes para a proteína GFP e quatro para a proteína TBCCD1 20aa. **(B)** Células HeLa a expressar a proteína GFP (**a**) e o plasmídeo TBCCD1 20aa em fusão com GFP (**b**) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em **a** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência de GFP nesta estrutura. Em **b** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 20aa e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados são representativos de um total de duas experiências independentes para a proteína GFP e três para a proteína TBCCD1 20aa. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

Como controlo, foram transfectadas células 293T e HeLa com um plasmídeo recombinante que permitia expressar apenas a proteína fluorescente GFP, de modo a comprovar que esta, quando é expressa sozinha, não se encontra no centrosoma. Deste modo a localização centrosomal dos primeiros resíduos de aminoácidos seria devida a esta sequência e não à presença de GFP. Estas células foram também analisadas por imunofluorescência indirecta, não se tendo observado uma localização da proteína GFP no centrosoma das células (figura IV.5. Aa e Ba). Com esta observação conclui-se que o *tag* GFP em princípio não influencia a localização centrosomal da proteína TBCCD1-GFP.

Com esta análise, foi possível verificar que o domínio constituído pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 por si só capaz de se localizar no centróssoma, quer em células em interfase (figura IV.5. Ac e Bb), quer em células em mitose (figura IV.5.Ab), comprovando que este domínio é crítico para a localização centróssomal da proteína independentemente da linha celular utilizada.

É ainda de referir que a expressão isolada destes primeiros 20 resíduos de aminoácidos, tem tendência a originar bastantes agregados no citoplasma, principalmente em redor do centróssoma, muitas vezes camuflando a sua própria co-localização. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos no perfil de hidropatia anteriormente descrito, uma vez que estes indicavam que esta zona da proteína era potencialmente hidrófoba.

No seu conjunto, estes resultados mostram que o domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal é determinante para a localização da proteína TBCCD1 no centróssoma, sendo interessante no futuro fazer uma análise mais detalhada para se determinarem quais os resíduos de aminoácidos dentro deste domínio determinantes para esta localização. Estes resultados levantaram a hipótese de que este domínio poderá constituir um *centrosome targeting motif*, podendo estar conservado entre os TBCCD1 de diferentes espécies.

IV.1.4 Comparação da sequência de resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 de diferentes espécies

Para investigar se o domínio constituído pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal era conservado entre os TBCCD1 de diferentes espécies, analisou-se a conservação das sequências dos resíduos de aminoácidos da proteína nesta zona através do alinhamento das mesmas pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Assim, foram escolhidas sequências de TBCCD1 de várias espécies ao longo da escala filogenética, de modo a abranger diferentes reinos e filo/divisão, tendo sido alinhadas para perceber se houve alterações significativas na proteína ao longo da evolução.

```

TBCCD1_H.sapiens          ---MDQSRVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVQIRATE 46
TBCCD1_P.troglydotes     ---MDQSRVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVQIRATE 46
TBCCD1_P.abelii          ---MDQSRVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVKIRATE 46
TBCCD1_N.leucogenys      ---MDQSRVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVQIRATE 46
TBCCD1_B.taurus          ---MDQSRVLLVWKAEFFIVGALQI PPP SKFSLHYLRKI-STYVTRTIE 46
TBCCD1_C.jacchus         ---MDESRLVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVQIRATE 46
TBCCD1_C.familiaris      ---MDQSGVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVTRAME 46
TBCCD1_S.scrofa          ---MDQSGVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-SSYVTRATE 46
TBCCD1_M.mulatta         ---MDQSSVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVQIRATE 46
TBCCD1_A.melanoleuca     ---MDQSGVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVTRATE 46
TBCCD1_R.norvegicus      ---MDQSGVLLVWKAEFFIVGALQE PPP SKLSLHYLRKI-AAYVTRATE 46
TBCCD1_M.musculus        ---MDQSGVLLVWKAEFFIVGALQE PPP SKFSLHYLRKI-ATYVTRATE 46
TBCCD1_E.caballus       ---MDHSGVLLVWKAEFFIVGALQVPPP SKFSLHYLRKI-STYVTRATE 46
TBCCD1_O.cuniculus       ---MDQSGVLLVWKAEFFIVGALQM PPP SKFSLHYLRKI-STYVTRASE 46
TBCCD1_C.domestica       ---MEQSAVHLVWKTEFFIVGALPL PPP AKFSLHYLRKI-AAYARARAAE 46
TBCCD1_X.laevis          ---MDGSRVQLWAKTDFLLGALQM PPP AKFSMHYLRKM-ASYVTRATE 46
TBCCD1_X.tropicalis      ---MDDSRVQLWVKTFLLGALQI PPP EKFSMHYLRKM-ATYVTRASE 46
TBCCD1_O.anatinus        ---MDEAAVRLVWKTEFFVVGTLAI PPP ARFGLRYLRV-SAYARTRAGE 46
TBCCD1_G.gallus          ---MAAAVSLVWKTEFFLLGALPV PPP ARLGPHYLRKM-AAYARARAAE 45
TBCCD1_T.guttata         ---MAAAVRLVWRTEFFLVGALP PPP ARLTPHYLRKV-AAYARARADQ 45
TBCCD1_D.rerio           ---MDKYTAVVWRPEFFLVGVLPA PPP SKFSMHYLRKM-ASYVTR--D 44
TBCCD1_T.nigroviridis    -----VLNWLVSFLPHTLQVAP STKLSMHYLRKM-SAYVTR--D 37
TBCCD1_S.kowalevskii     ---ATFMSVSLVWKPEFFNFALQI PPP HPHKLSMHYLRKI-AVYAKTRGK- 46
TBCCD1_C.fornicata       ---MSSRVGVELVWKAEFFSYGALPVA PPP HPRLNFTNIKKI-VIYAKNK-GN 46
TBCCD1_S.mansoni         MGKASHVTLVSLWPRAEFFAYGIFQVH PPP HPRLAVHNIKKL-VTYAKTK-SK 48
TBCCD1_B.floridae        -----LWVRPEPFTLGVLP PPP HPKLGLHYLRKI-SVYAKTKGK- 38
TBCCD1_S.purpuratus      ---MAHASANLWLFKFTFNIGILPV PPP HPHKLSLHYLRKI-ALYAKNRGK- 45
TBCCD1_N.vectensis       ---MDSTSLSLVWRAEFFDCGAIHV PPP PKLTLHNLHKL-SIYSRSGK- 45
TBCCD1_T.adhaerens       ---MS---VILVWHQPLDCLLHLSFYPRFTYNNLLKL-AVYAKAK-EK 42
TBCCD1_S.japonicum       ---MSMISRQTIARSSATLDGATLKIHRHYSYLYLLSP--MRSVTLDKC 45
TBCCD1_C.intestinalis    ---MVDACLWLNPDIEYHGV--VYAHSKLSIPYLKVV-ITYAKSKGIN 42
TBCCD1_O.dioica          ---MN---EVQLWPNRRIFFEYGI--VYSHPKITFTNAERI-IKYSLTK-EN 41

TBCCD1_A.thaliana        -----MTEEQD-----LIDQSP PPSAPDPEPNSSTNPNS-VIHPRRVSFE 39
TBCCD1_M.truncatula      -----MTE-----PPESAPSTPPPPPTS-TTVIHPREFFE 31
TBCCD1_P.sitchensis     ---MTENEVPLFHLRREPFEYGLLPLPHLMFTDGTST-LKSVREKLLQ 45
TBCCD1_R.communis        ---MTDSVE--P-PSTS---TDDPN-NPNPNPNPNPS-LIHPREFFE 38
TBCCD1_P.trichocarpa     ---MTTEITSTPDNTPNAPTPTPTPTPTPNPNPSS-LIHPREFFE 45
TBCCD1_Z.mays            ---MADEALDQP-PDAAPSPSLAPATPPAPATSSP-AA-LLRPRRAFE 43
TBCCD1_S.bicolor         ---MADEALDQP-PDAAPSPSPAPATPPAPATPSAAA-LLRPRRAFE 44
TBCCD1_V.vinifera        ---MPGSEIDAVGADVYDLILFLYIQSYKRLLPRTHKDS-AAVADVWPST 46
TBCCD1_P.patens          -----NNSPPPPQPACNTEP-CLHVRREAFE 26

TBCCD1_E.siliculosus    ---MISSCFLRTKRDRVPVCEVAQYLMGALTVNDVVYP-IPSPSAIFL 45
TBCCD1_C.reinhardtii     ---MLPREVWEYGG-LPIQALCPQLDNVQTLLSFHG--KLFARSKPGP 43
TBCCD1_O.lucimarinus     ---MLYLAACYATARGGGATLRDEARRCADEDASEGNEWVGREVSAR 46
TBCCD1_M.pusilla         ---MRESGGTEEWPIAGDAALDATTCDGGVNGGAGSGSS--PRSSPGREA 46
TBCCD1_O.tauri          ---MAVTVDESTLKTVVTVDGAHKTTVVRRQGYESTRAASGSAASCRTSP 47

TBCCD1_P.pallidum        ---MCRIEYKIYQRETKRIDLLQFNIQCLYLAGNYIKT-ILRTENDFYL 46
TBCCD1_D.purpureum       ---MIMNQFNICNVINQCKKTILKIEQDFISAPNGIINV-NENS DSP-FL 46
TBCCD1_M.brevicollis     -----MTTTTTLNQPQQQQQQQQQQQQQQQQQNYGQHQAPEVVS DLG 45
TBCCD1_T.thermophila     ---MNSSSSSGSINDSQQLHIRSDVFEHAVFPTPAKLTLLINLVHLFGSL 47

```

Figura IV.6. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos das proteínas TBCCD1 ao nível da região N-terminal. As seqüências de resíduos de aminoácidos das proteínas TBCCD1 (quadro VIII.1. em anexo) foram alinhadas no programa ClustalW, sendo apresentado na figura o resultado do alinhamento ao nível da região N-terminal, contendo em particular o domínio correspondente aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína. Neste alinhamento é possível observar-se que os resíduos de aminoácidos responsáveis pela localização da proteína no centróssoma (salientados a cinzento-claro) não são conservados ao longo da escala filogenética, estando apenas conservados dentro do reino *animalia*, principalmente nos vertebrados. A cinzento-escuro está salientada a conservação dos resíduos de aminoácidos VPPP, um domínio VxPx (sendo x um aminoácido qualquer) responsável pela localização da proteína rodopsina no cílio primário (Mazelova et al., 2009).

Através do alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas TBCCD1 escolhidas (figura IV.6.) verificou-se que os resíduos de aminoácidos responsáveis pela localização centrossomal da proteína (salientado a cinzento-claro) não são muito conservados ao longo da escala filogenética. Em particular, a região correspondente aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal do TBCCD1 encontra-se grandemente conservada apenas dentro dos organismos pertencentes ao reino *animalia*, com maior percentagem de resíduos conservados entre os vertebrados, estando presentes em organismos muito afastados evolutivamente (figura IV.6.). Nos reinos *plantae* e *protista* não há conservação dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal das proteínas TBCCD1. Estes resultados vêm mais uma vez apoiar que o domínio composto pelos 20 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal deverá constituir um motivo crítico para a localização da proteína no centrossoma, como já foi referido anteriormente, uma vez que não se encontra conservado em organismos que não possuem este organelo, como a planta *Arabidopsis thaliana*. Curiosamente, a alga *Chlamydomonas reinhardtii* é um organismo que possui corpos basais, não apresentando no entanto este domínio conservado na sua sequência, o que pode indicar que este domínio composto pelos 20 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal esteja relacionado com a especialização da função da proteína TBCCD1 no centrossoma de vertebrados. Estudos recentes propõem que o organismo ancestral dos vários grupos de eucariotas seria flagelado dada a presença de corpos basais e cílios/flagelos em todos os grupos de organismos eucariotas (Carvalho-Santos et al., 2010). Assim, a presença da proteína TBCCD1 em vários organismos sugere a sua presença também no ancestral comum a estes e que esta desempenhe funções essenciais em todos os tipos de células eucariotas não obrigatoriamente relacionadas com a estrutura do centrossoma/corpos basais.

De especial relevo é a existência de um domínio VxPx (sendo x um aminoácido qualquer), na região N-terminal do TBCCD1. Este motivo foi recentemente identificado na proteína rodopsina e é responsável pela localização da proteína no cílio primário, correspondendo a um *ciliary targeting motif* (Mazelova et al., 2009). Estão descritas várias mutações na rodopsina dentro deste motivo que levam a formas graves de retinite pigmentosa, uma vez que a proteína deixa de ser reconhecida não sendo levada para o local correcto (Deretic et al., 2005). Na proteína TBCCD1 humana este motivo corresponde a uma sequência de resíduos de aminoácidos VPPP (salientado a cinzento-escuro na figura IV.6.) na região N-terminal e está conservada entre várias espécies (figura IV.6.). Esta sequência de resíduos de aminoácidos encontra-se conservada para além dos organismos do reino *animalia*, em algumas plantas

como a *Arabidopsis thaliana*. Curiosamente, plantas que não possuem este motivo conservado, possuem no entanto vários resíduos de prolina na região, ao contrário das algas, como a *Chlamydomonas reinhardtii*. A presença deste motivo em vários dos organismos analisados sugere que a sua existência será importante para o desempenho de algum papel da proteína, tanto a nível da localização da proteína no cílio primário como provavelmente a nível da sua estrutura tridimensional devido à sequência dos três resíduos de prolina, uma vez que estes resíduos são importantes da definição das estruturas das proteínas.

IV.1.5 Estudo da localização da proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* em células humanas

No seguimento desta análise, foi estudada a proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana*, uma planta que possui duas proteínas ortólogas do TBCCD1. O facto de o TBCCD1 ser uma proteína centrossomal torna curiosa a sua presença na *A. thaliana* uma vez que esta planta não possui esta estrutura, mas possui centros organizadores de microtúbulos (Gonçalves, 2010). Além disso, como verificado nos resultados obtidos no alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das regiões N-terminal do TBCCD1 de várias espécies, a proteína de *Arabidopsis thaliana* não apresenta uma conservação de sequência nos primeiros 20 resíduos de aminoácidos, região crítica para a localização centrossomal. Assim, foi testado se a proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana*, quando expressa em células de mamífero, se localiza no centrossoma. Para isso, a sequência codificante da proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* foi clonada num vector de expressão de mamífero em fusão com a proteína fluorescente GFP no C-terminal. O plasmídeo recombinante foi usado para transfectar células HEK 293T, de modo estudar a sua localização na célula através da expressão da proteína de fusão.

HEK 293T

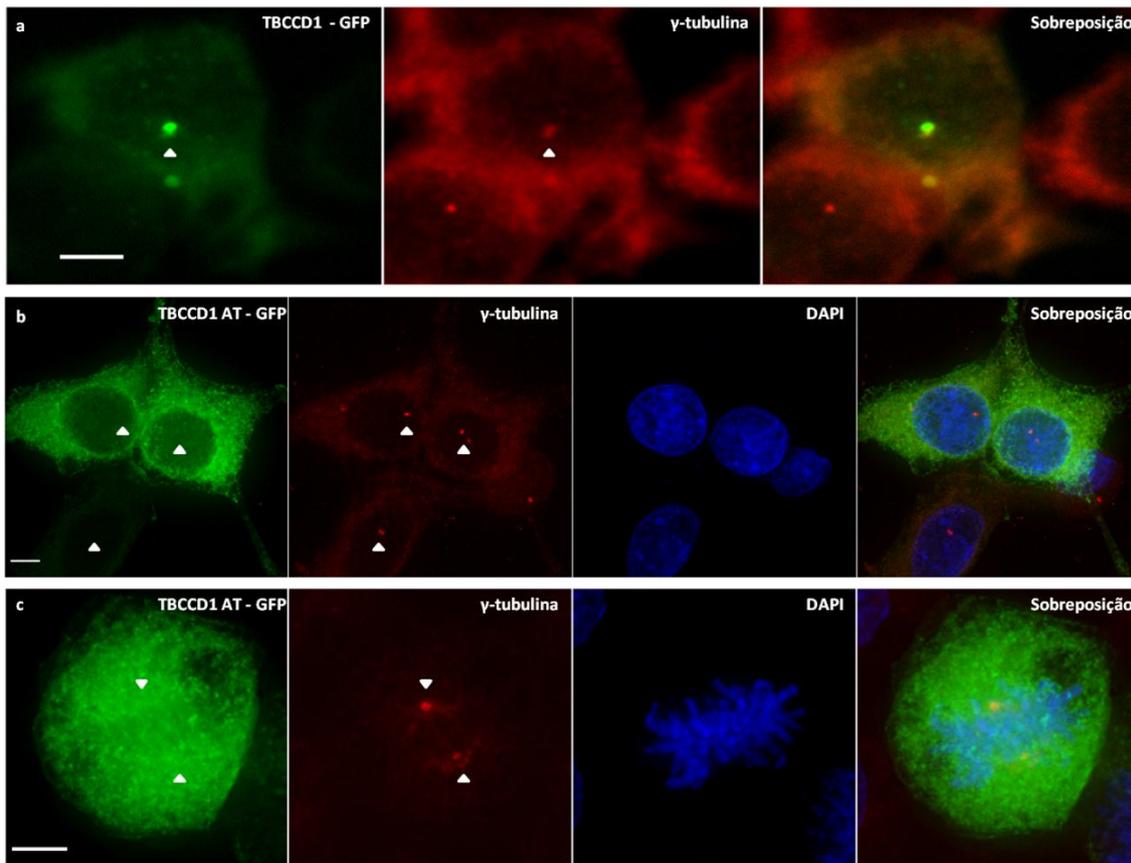


Figura IV.7. Análise da localização da proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* em células de mamífero através da expressão de proteínas de fusão com GFP. Células HEK 293T a expressar a proteína de fusão TBCCD1-GFP (a) e o TBCCD1 de *Arabidopsis Thaliana* em fusão com GFP (b e c) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. (a, b) Células em interfase; (b) Célula em mitose. Em a as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina e para a proteína de fusão nos centrosomas. Em b e c as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência de proteína de fusão nesta estrutura. Os resultados apresentados provêm de uma única experiência independente para a proteína de fusão TBCCD1-GFP e duas experiências independentes para a proteína de fusão TBCCD1 AT-GFP. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

Os resultados apresentados na figura IV.7. b e c mostram que a proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana*, quando expressa em células de mamífero, não se localiza no centrosoma estando apenas presente no citoplasma, contrariamente com o que acontece com a proteína TBCCD1 humana (figura IV.7. a). Estes resultados vêm de encontro ao demonstrado no alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das regiões N-terminal do TBCCD1 de várias espécies, uma vez que a proteína de *Arabidopsis thaliana* não

apresenta uma conservação de sequência nos primeiros 20 resíduos de aminoácidos, confirmando mais uma vez que esta região é muito importante para a localização centrossomal da proteína, podendo constituir um *centrosome targeting motif*, pelo menos nos vertebrados. Assim, a presença da proteína TBCCD1 não está directamente relacionada com a presença de centrossomas e centríolos e estes resultados vêm dar ênfase à hipótese de que o TBCCD1 desempenha um papel importante fora do centrossoma, uma vez que espécies que não possuem esta estrutura também apresentam esta proteína. Assim, o estudo da função da proteína TBCCD1 em plantas poderá providenciar pistas acerca da função desta proteína em células que não possuem centrossoma.

IV.1.6 Estudo da importância dos domínios funcionais CARP e TBCC na proteína TBCCD1 humana

No presente trabalho, decidiu-se também avaliar a região C-terminal, uma vez que é nesta região que se encontram os domínios funcionais CARP e TBCC. Para se estudar a região C-terminal da proteína TBCCD1, nomeadamente para tentar identificar as possíveis funções dos domínios funcionais TBCC e CARP no TBCCD1, foi construído um vector recombinante de expressão de mamífero contendo a região codificante do gene *tbccd1* à qual foi removida grande parte da região C-terminal, incluindo os dois domínios funcionais acima referidos em fusão com a proteína fluorescente GFP (figura IV.8.). O plasmídeo recombinante assim obtido foi utilizado para transfectar células de mamífero de modo a estas expressarem a proteína TBCCD1 truncada de fusão e assim estudar a sua localização/função na célula.

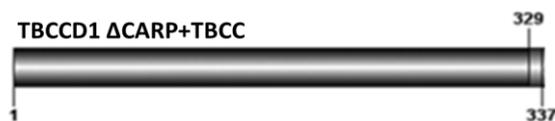
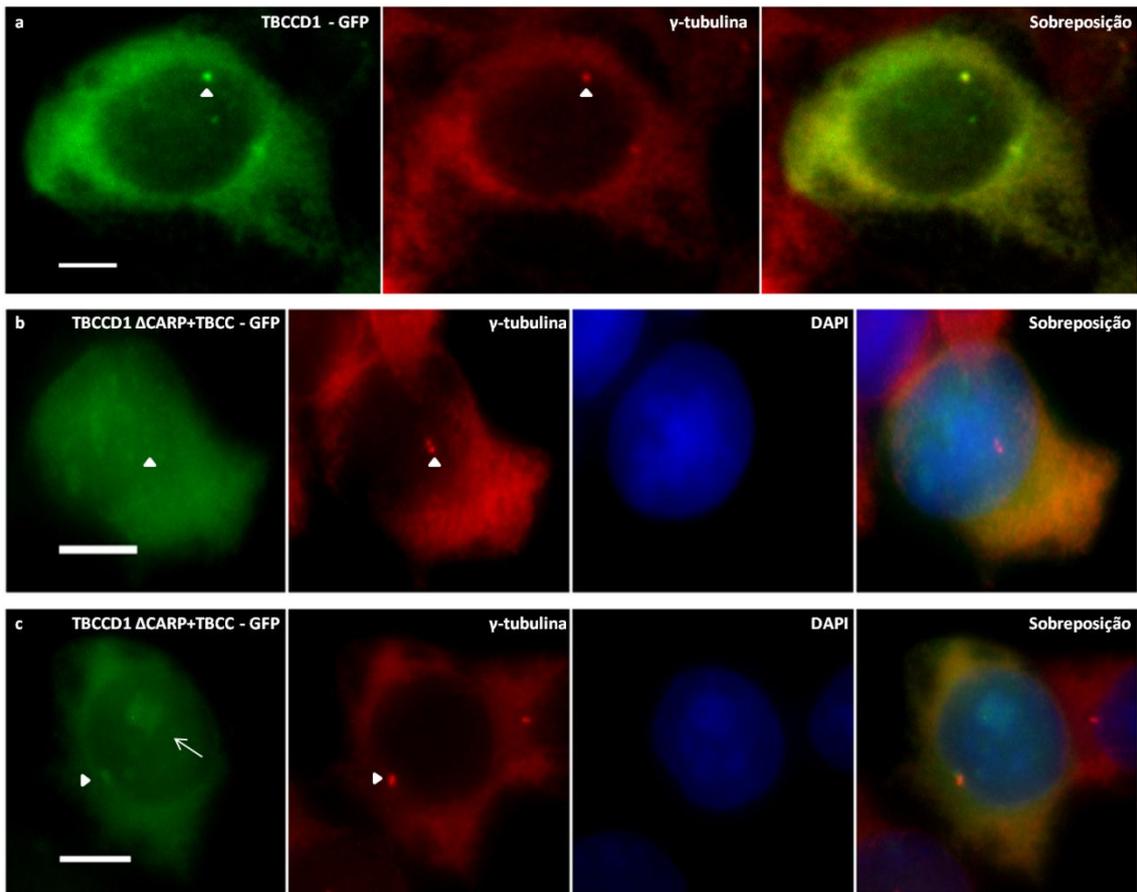


Figura IV.8. Forma truncada da proteína TBCCD1 humana com deleção na região C-terminal. Representação esquemática da proteína TBCCD1 humana com deleção no C-terminal TBCCD1 Δ CARP+TBCC. Esta proteína é constituída apenas pelos primeiros 336 resíduos de aminoácidos (incluindo a arginina na posição 336) relativamente ao TBCCD1 selvagem.

Através da análise dos resultados obtidos, efectuada em células HEK 293T e HeLa, observou-se, ao contrário do que acontece na proteína de fusão TBCCD1-GFP (figura IV.9. Aa e Ba), que a proteína de fusão TBCCD1 com a deleção nos domínios funcionais CARP e TBCC não se localiza no centróssoma, como se observa pelo desaparecimento da marcação da GFP no centróssoma (figura IV.9. Ab e Bb). Em alguns casos a marcação centróssomal é apenas vestigial (figura IV.9. Ac e Bc). De facto, na maioria das células HEK 293T e HeLa analisadas, a proteína TBCCD1 Δ CARP+TBCC encontra-se localizada difusamente no citoplasma e também dentro do núcleo.

Estes resultados mostram que a ausência dos domínios CARP+TBCC levam à perda da capacidade da proteína de localizar no centróssoma apesar dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos estarem presentes. Curiosamente, a perda dos domínios referidos leva a que a proteína se acumule no núcleo, o que nunca foi observado quando a proteína TBCCD1-GFP é expressa nas linhas celulares humanas utilizadas neste estudo, pelo menos nas condições até aqui estudadas. Deste modo, a localização no centróssoma parece depender simultaneamente da presença dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos e da presença do domínio CARP e TBCC. Poderíamos especular que, ou a interacção do domínio N-terminal com a região C-terminal é requerida para a localização centróssomal da proteína, ou alternativamente um dos domínios (provavelmente o C-terminal devido à sua localização e dimensão) poderá ser requerido para reter/manter a proteína no centróssoma, levando a sua perda à localização anormal no núcleo. Esta última localização é interessante uma vez que por vezes parece que a proteína truncada se acumula de forma preferencial em certas regiões do núcleo (figura IV.9. Bb). Assim, serão necessárias experiências adicionais para clarificar os fenótipos gerados pela expressão da proteína truncada TBCCD1 Δ CARP+TBCC.

A - HEK 293T



B- HeLa

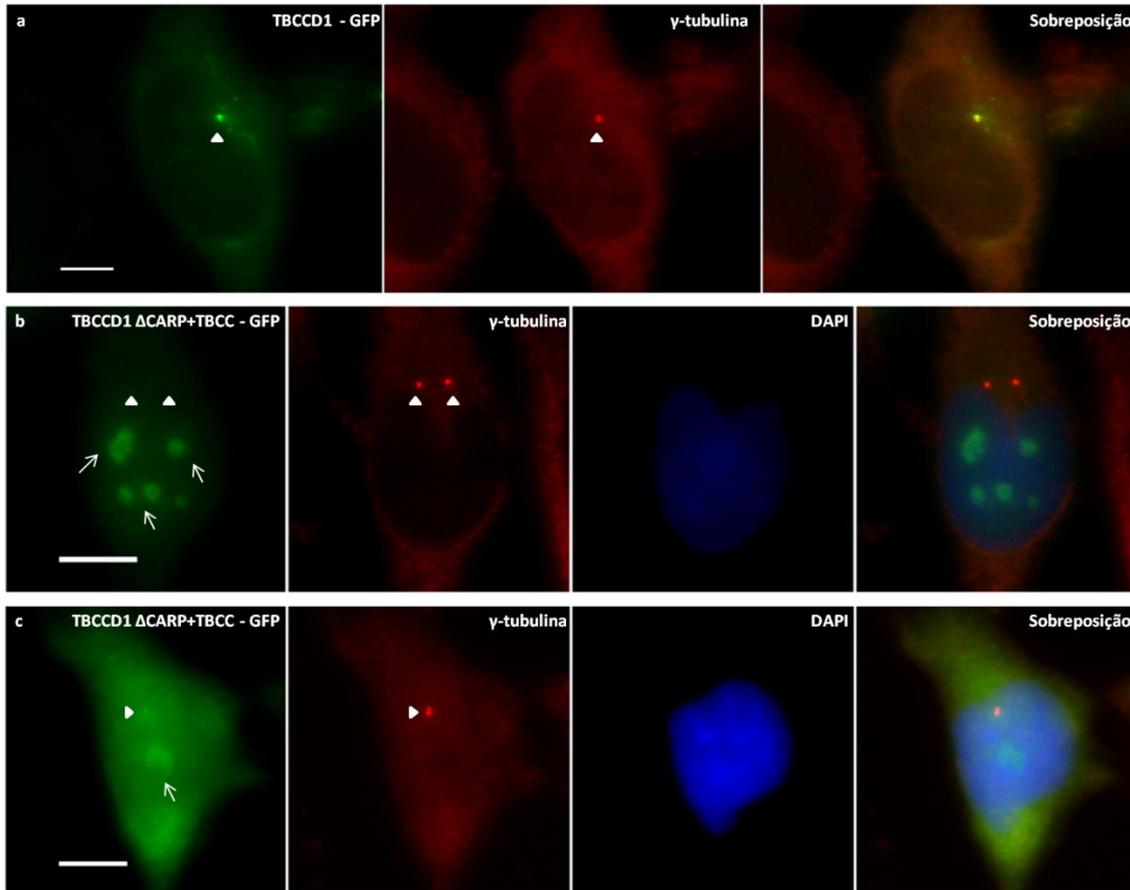


Figura IV.9. Estudo do impacto da remoção da região C-terminal da proteína TBCCD1 humana através da expressão de proteínas de fusão com tags fluorescentes. (A) Células HEK 293T a expressar a proteína de fusão TBCCD1-GFP (a) e a proteína TBCCD1 ΔCARP+TBCC em fusão a proteína fluorescente GFP (b,c) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. (Aa) As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina e para a proteína de fusão nos centrosomas. (Ab) As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína de fusão nesta estrutura; (Ac) As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a diminuição da expressão da proteína de fusão nesta estrutura. Os resultados apresentados são representativos de duas experiências independentes para b e c e uma única experiência independente para a. (B) Células HeLa a expressar a proteína de fusão TBCCD1-GFP (a) e a proteína TBCCD1 ΔCARP+TBCC em fusão com a proteína fluorescente GFP (b,c) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. (Ba) As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina e para a proteína de fusão nos centrosomas. (Bb) As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína de fusão nesta estrutura; (Bc) As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a diminuição da expressão da proteína de fusão nesta estrutura. Os resultados apresentados são representativos de duas experiências independentes para b e c e uma única experiência independente para a. As setas apontam para a

marcação do TBCCD1 Δ CARP+TBCC no núcleo. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

A presença de um domínio CARP no TBCCD1 sugere um possível papel desta proteína na regulação do citoesqueleto de actina, podendo estar envolvida no *cross-talk* entre o citoesqueleto de actina e microtúbulos, uma vez que este domínio funcional está relacionado com as proteínas CAP (*cyclase-associated proteins*), proteínas que se ligam a monómeros de G-actina e estão envolvidas na polimerização do citoesqueleto de actina (Hubberstey & Mottillo, 2002). Assim, como a proteína TBCCD1 Δ CARP+TBCC – GFP não possui o domínio CARP, decidiu-se analisar também o citoesqueleto de actina, para verificar se este se encontra afectado nas células que expressam a proteína truncada. As células HEK 293T apresentam uma forma celular que torna difícil a análise de detalhes no citoesqueleto, tornando-as uma má opção para este estudo. Assim, células HeLa foram transfectadas com o vector PCF5 contendo o gene *tbccd1* Δ CARP+TBCC em fusão com o gene codificante para a proteína GFP, e seguidamente coradas com faloidina e analisadas por microscopia de fluorescência (figura IV.10.).

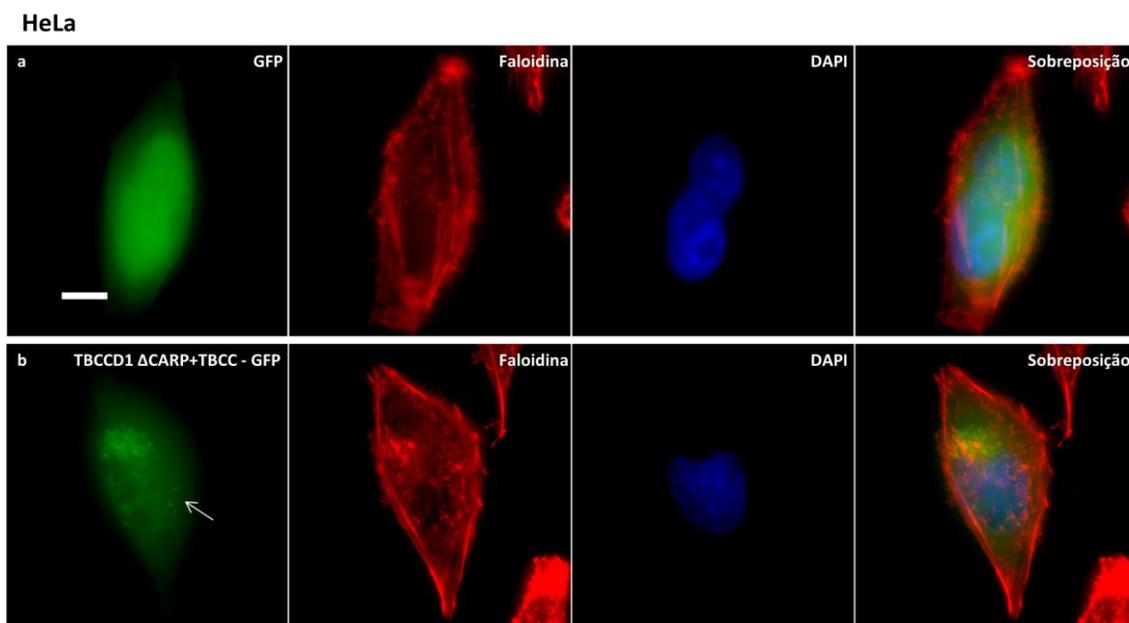


Figura IV.10. Estudo do citoesqueleto de actina em células HeLa da proteína humana TBCCD1 Δ CARP+TBCC em fusão com GFP. Células HeLa a expressar a proteína GFP (a) e a proteína de fusão TBCCD1 Δ CARP+TBCC em fusão com a proteína fluorescente GFP (b), foram processadas para análise de

fluorescência indirecta com o corante faloidina que marca o citoesqueleto de actina. Em **a** e **b** os resultados apresentados são representativos de uma única experiência independente. As setas apontam para a marcação do TBCCD1 Δ CARP+TBCC no núcleo. Em **a** e **b** o DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

Pela observação dos resultados da figura IV.10., verificou-se que não existem diferenças óbvias no citoesqueleto de actina entre as células controlo (figura IV.10. a) e as que expressam o clone com a deleção na região C-terminal do TBCCD1 (figura IV.10. b). Ambas as populações apresentavam feixes de actina não parecendo existirem problemas na organização ou arranjo dos filamentos de actina. Desta forma, não se constatou qualquer problema no citoesqueleto de actina nas células HeLa transfectadas com o TBCCD1 Δ CARP+TBCC, não se tendo identificada fenótipo relevante. Deste modo, não se pode concluir qual a função do domínio CARP na proteína TBCCD1 pelo menos relativamente ao citoesqueleto de actina.

Porém, a expressão da proteína TBCCD1 Δ CARP+TBCC-GFP pode levar a alterações subtis nas células que podem estar mascaradas pela expressão da proteína TBCCD1 endógena. Por outro lado a função do domínio CARP poderá residir no centróssoma e a proteína sem este domínio não vai para este local, encontrando-se lá a proteína TBCCD1 endógena selvagem que poderá desta forma mascarar também alguma alteração e o papel deste domínio.

IV.2 Estudo de mutações pontuais no gene que codifica o TBCCD1

Como referido anteriormente, um dos principais objectivos deste trabalho era o estudo da função da proteína TBCCD1 humana, nomeadamente funções relacionadas com a regulação do funcionamento do citoesqueleto de microtúbulos e a ligação do centróssoma ao núcleo. O TBCCD1 é uma proteína centróssomal que é relacionada em termos de sequência com as proteínas TBCC e RP2, uma vez que possui os domínios funcionais TBCC e CARP. Embora a proteína TBCCD1 não possua os resíduos conservados descritos como sendo importantes para esta actividade no TBCC e RP2, nem seja capaz de reverter o fenótipo da deleção do gene *cin2*, gene homólogo do TBCC em levedura (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010), a presença destes domínios funcionais sugere a hipótese do TBCCD1 possuir uma actividade GAP, possivelmente para outro substrato que não a β -tubulina. As proteínas TBCC e RP2

possuem funções em processos relacionados com o citoesqueleto de microtúbulos, uma vez que o TBCC participa na via de *folding* da tubulina (Tian et al., 1996) e a RP2 participa no mecanismo de controlo de qualidade da tubulina no corpo basal do flagelo de *T. brucei* (Stephan et al., 2007) e é essencial para o tráfico de vesículas do complexo de Golgi para o corpo basal do cílio (Evans et al., 2010). Por outro lado, o silenciamento do TBCCD1 pela técnica RNAi provoca problemas na ligação do centrossoma ao núcleo, sendo este até à data o fenótipo mais importante identificado a quando do silenciamento do *tbccd1*. Assim, é importante estudar o papel da proteína TBCCD1 humana em linhas celulares humanas, uma vez que esta proteína pode também estar envolvida em processos relacionados com o citoesqueleto de microtúbulos e para tentar perceber melhor o seu envolvimento na ligação do centrossoma ao núcleo.

IV.2.1 Introdução de mutações pontuais na proteína TBCCD1 – critérios de escolha

Para identificar e estudar possíveis funções da proteína TBCCD1 humana, a estratégia escolhida foi a introdução de mutações pontuais na sequência codificante do gene *tbccd1* que conduzem ao aparecimento de um novo resíduo de aminoácido na proteína. O TBCCD1, como já foi referido anteriormente, partilha os domínios funcionais TBCC e CARP com as proteínas TBCC e RP2, no entanto até agora não se encontrou nenhuma relação funcional entre estas proteínas e o TBCCD1. Assim, de forma a estudar a função do TBCCD1, o local escolhido para introduzir as mutações foi o domínio TBCC. Para tal fez-se um alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos deste domínio das proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1 (figura IV.11.), de modo a ser possível identificar resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 conservados entre as três proteínas o que poderia sugerir terem funções críticas e assim serem potenciais alvos para mutar.

TBCC	203	QRDVLLTELSNCTVRLYGNPNTLRLTKAHSCKLLCGP	VSTSVFLED	CSDCVLAVA	COQLR	
RP2	59	GQQFLIQDCENCNIYIFDHSATVTIDDC	TNCIIIFL	GPVKGSVFFRN	CRDCKCTLAC	QQFR
TBCCD1	329	GAHVKIHRCNESFIYLLSPLRSVTIEKCRNSIFVL	GPVGTTLHLHSC	DNVKVIAV	CHRLS	
		.. : . . . : : . : : :	***	: : : : *	: *	: . * : : :
TBCC		IHSTKDTRIFLQVTSRAIVE	DCS-GIQE	FAPYTWSY	FEIDKDFESS	CLDRSKNNW
RP2		VRDCRKLEVLCCATQPIIE	SSS-NIKF	GCFQWY	YELAFQKDA	GLSIFNNTWSNIHDF
TBCCD1		ISSTTGCI FHVLTPT	RPLILSGNQ	TVTFA	PFHTHY	FMLEDHMARTGLATVP
		: : : : : . . . : *	: : *	: : *	: : *	: : *

Figura IV.11. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos dos domínios TBCC das proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1 humanas. A preto estão realçados os resíduos de aminoácidos conservados entre as três proteínas. Salientado a cinzento estão os resíduos de aminoácidos conservados entre as proteínas TBCC e RP2 que foram demonstrados experimentalmente como sendo cruciais para a actividade GAP destas proteínas (Veltel et al., 2008). A seta assinala o resíduo de arginina conservado entre as proteínas TBCC e RP2 e descrito como crucial para a actividade GAP de ambas (Bartolini et al., 2002).

A proteína TBCCD1 humana, apesar de partilhar o domínio funcional TBCC com as proteínas TBCC e RP2, não possui o resíduo de arginina conservado entre ambas as proteínas e que é crucial à actividade GAP para a β -tubulina de ambas (Gonçalves et al., 2010a; Gonçalves, 2010). No entanto, o TBCCD1 possui um resíduo de arginina próximo dessa posição conservada (a dois resíduos de distância), tendo sido proposto que este poderia desempenhar a mesma função, talvez não para a tubulina mas para outros putativos substratos. Assim, para testar a hipótese de o TBCCD1 partilhar funções com as proteínas TBCC e RP2, possuindo uma actividade de GAP, decidiu criar-se uma mutação no resíduo de arginina do TBCCD1 na posição 386, de modo a perceber se será um resíduo crítico para a função do TBCCD1.

Por outro lado, a proteína RP2 está ligada a uma forma grave da doença retinite pigmentosa associada ao cromossoma X, caracterizada pela degeneração progressiva da retina resultando em cegueira. O gene *X-linked retinitis pigmentosa* (XLRP) que codifica esta proteína aparece mutado em aproximadamente 18% dos pacientes com a doença (Schwahn et al., 1998). Assim, como o TBCCD1 é relacionado com a proteína RP2, e como a maioria das mutações descritas nesta proteína que ocorrem com maior incidência nos pacientes estão localizadas no domínio TBCC (Breuer et al., 2002), seria interessante determinar se existe uma relação estrutural e funcional entre as duas proteínas. Para isso, foi feita uma pesquisa exhaustiva de todas as mutações descritas na proteína RP2, dando especial atenção às localizadas no domínio TBCC.

As mutações encontradas até à data no domínio TBCC da RP2 encontram-se sumarizadas no quadro IV.1.

Quadro IV.1. Mutações identificadas no domínio TBCC da proteína RP2. A maioria das mutações identificadas até à data na proteína RP2 em doentes com retinite pigmentosa está localizada no domínio TBCC (Bader et al., 2003; Breuer et al., 2002; García-Hoyos et al., 2006; Jin, Liu, Hayakawa, Murakami, & Nao-i, 2006; Neidhardt et al., 2008; Prokisch, Hartig, Hellinger, Meitingner, & Thomas Rosenberg, 2007; Sharon et al., 2000, 2003). fs=framshift.

Tipo de mutação	Alteração no DNA	Alteração na proteína
<i>Missense</i>	G200A	Cys67Tyr
<i>Missense</i>	G257A	Cys86Tyr
<i>Missense</i>	C284T	Pro95Leu
Delecção	350-351	Phe117fsTer155
<i>Missense</i>	G353A	Arg118His
<i>Missense</i>	C352G	Arg118Gly
<i>Missense</i>	C352T	Arg118Cys
<i>Nonsense</i>	C358T	Arg120Stop
<i>Nonsense</i>	C400T	Gln134Stop
Delecção	409-411	Ile137del
<i>Missense</i>	C419T	Ser140Phe
<i>Nonsense</i>	C453A	Tyr151Stop
Inserção	515 ins G	Ser172fsTer173

A partir do alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos do domínio TBCC das proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1 realizado anteriormente, determinou-se se alguns dos resíduos de aminoácidos que aparecem mutados na proteína RP2 em doentes com retinite pigmentosa são conservados entre esta e as outras duas proteínas. Desta forma, verificou-se que existem resíduos de aminoácidos que podem sofrer mutações na proteína RP2 e que são conservados entre esta e as proteínas TBCC e TBCCD1 (figura IV.12.).

```

TBCC      203  QRDVLLTELSNCTVRLYGNPNTLRLTKAHSCKLLCGEIVSTSVFLEDCSDCVLAVACQQLR
RP2       59  GQQFLIQDCEENCNIYIFDHSATVTIDDCTNCIIFLGEIVKGSVFFRNCRDCKCTLACQQFR
TBCCD1    329  GAHVKIHRNESFIYLLSPLRSVTIEKCRNSIFVLGEIVGTTLHLHSCDNVKVIAVCHRLS
      . . : . . . : : . : : . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :
      . . : . . . : : . : : . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

TBCC      IHSTKDTRIFLQVTSRAIVEDCS-GIQFAPYTWSYPEIDKDFESSGLDRSKNNWNVDDDF 321
RP2       VRDCRKLEVFLLCCATCPITSS-NIKFGCFQWYPELAFQFKDAGLSIFNNTWNIHDF 177
TBCCD1    ISSITGCI FHVLTPTRPLLSGNQTVTFAPFHHTYPMLEDHMARTGLATVPNYWDNPM-- 446
      : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

```

Figura IV.12. Resíduos de aminoácidos mutados no domínio TBCC da proteína RP2 e conservados entre as proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1 humanas. A preto estão salientados os resíduos de aminoácidos encontrados mutados no domínio TBCC da proteína RP2 em doentes com retinite pigmentosa. A cinzento estão realçados os resíduos de aminoácidos das proteínas TBCC e TBCCD1 que são conservados com os resíduos mutados da proteína RP2.

No quadro IV.2. encontram-se sumarizadas as mutações encontradas na sequência de resíduos de aminoácidos do domínio TBCC da proteína RP2 e a respectiva conservação dos mesmos resíduos nas proteínas TBCC e TBCCD1.

Quadro IV.2. Conservação dos resíduos de aminoácidos mutados na proteína RP2 entre esta e as proteínas TBCC e TBCCD1. Alguns dos resíduos de aminoácidos mutados na proteína RP2 em doentes com retinite pigmentosa são conservados nas proteínas TBCC e TBCCD1.

Mutação em RP2	Conservado no TBCC	Conservado no TBCCD1
Cisteína 67	Não	Sim
Cisteína 86	Não	Sim
Prolina 95	Sim	Sim
Fenilalanina 117	Não	Não
Arginina 118	Sim	Não
Arginina 120	Não	Não
Glutamina 134	Não	Não
Isoleucina 137	Não	Sim
Serina 140	Não	Não
Tirosina 151	Não	Não
Serina 172	Não	Não

Dos onze resíduos de aminoácidos com mutações identificadas no domínio TBCC da proteína RP2 em doentes com retinite pigmentosa até à data, apenas quatro são conservados na proteína TBCCD1. Assim, a partir destes resultados foi possível escolher qual dos quatro resíduos de aminoácidos do TBCCD1 poderiam ser melhores candidatos a apresentar um papel importante na função da proteína TBCCD1. Desta forma, o resíduo de aminoácido do TBCCD1 humano escolhido nestas condições para ser mutado foi a prolina 365, uma vez que, para além estar mutado na proteína RP2 em algumas formas de retinite pigmentosa e de estar conservado no TBCCD1, está também conservado na proteína TBCC, sugerindo que este aminoácido seja importante na função ou estrutura das três proteínas. Para além disso, as prolinas são aminoácidos importantes na estrutura tridimensional das proteínas, uma vez que possuem uma estrutura quimicamente coesa e rígida, sendo mesmo o aminoácido mais rígido dos vinte que são codificados geneticamente. Esta rigidez é conferida pelo seu grupo R em anel que tem a capacidade de forçar a cadeia polipeptídica a dobrar-se.

Por outro lado, a proteína TBCCD1 possui dois motivos na região N-terminal, os motivos VxPx (sendo x um aminoácido qualquer) (Mazelova et al., 2009) e KRAK, que podem ser eventuais candidatos a motivos responsáveis pela localização da proteína no cílio primário. Como referido anteriormente, o motivo VxPx foi recentemente identificado na proteína rodopsina (Mazelova et al., 2009) e existem já várias mutações descritas neste motivo que levam a formas graves de retinite pigmentosa, uma vez que a proteína deixa de ser reconhecida não sendo levada para o local onde executa a sua função (Deretic et al., 2005). O motivo KRAK é um potencial *ciliary localization signal* no TBCCD1, uma vez que a proteína KIF17 possui um motivo semelhante e com a função referida. A proteína KIF17 possui então um domínio KRKK que é responsável pela sua localização no cílio, pois quando os resíduos de aminoácidos que o constituem foram mutados ocorreu uma abolição da localização da proteína no cílio (Dishinger et al., 2010). Na proteína TBCCD1 os motivos VxPx e KRAK correspondem às sequências de resíduos de aminoácidos VPPP (resíduos 22-25) e KRAK (resíduos 292-295), respectivamente. De modo a determinar se estes motivos poderiam estar também na base da localização do TBCCD1 nos cílios primários decidiu criar-se mutações pontuais em ambos os motivos, nos resíduos conservados de cada um. No motivo VxPx o resíduo de aminoácido escolhido para mutar foi a prolina na posição 24 do TBCCD1 humano, uma vez que é conservada neste motivo e, como já foi referido anteriormente (ver capítulo IV.1.4.), faz parte de um conjunto de três prolinas conservado na proteína TBCCD1 de várias espécies, sendo por isso um bom alvo de

estudo (figura IV.6.). No motivo KRAK optou-se por criar as mutações pontuais nas duas lisinas conservadas do motivo, nas posições 292 e 295 da proteína TBCCD1 humana.

Assim, no total foram escolhidos cinco resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 humana para mutar pontualmente, os quais estão apresentadas no quadro IV.3.

Quadro IV.3. Resíduos de aminoácidos e respectivas posições na sequência da proteína TBCCD1 humana escolhidos para a criação de mutações pontuais. Foram escolhidos 5 resíduos de aminoácidos em diferentes regiões da sequência codificante da proteína TBCCD1 para a criação de mutações pontuais.

Aminoácido	Posição	Local	Região
Prolina	24	Motivo VxPx	N-terminal
Lisina	292	Motivo KRAK	N-terminal
Lisina	295	Motivo KRAK	N-terminal
Prolina	365	Prolina conservada (TBCCD1, TBCC e RP2)	C-terminal
Arginina	386	Possível Arginina funcional formando um dedo de arginina característico das proteínas GAP (Bartolini et al., 2002)	C-terminal

IV.2.2 Construção de formas da proteína TBCCD1 humana com mutações pontuais

Na introdução das mutações pontuais na sequência codificante da proteína TBCCD1 humana, os aminoácidos escolhidos foram substituídos por um aminoácido diferente, sendo cada mutação introduzida isoladamente, resultando em clones distintos cada um contendo apenas uma mutação pontual. Assim, as alterações na sequência codificante da proteína foram escolhidas de modo a conduzir ao aparecimento de um novo resíduo de aminoácido na sequência da proteína, alterando-se apenas um nucleótido em cada codão correspondente ao resíduo de aminoácido que se quer mutar. Para escolher qual seria a melhor alteração a

produzir na sequência, se eventualmente afectar a eficiência de tradução da proteína, recorreu-se a uma ferramenta do site <http://www.kazusa.or.jp/codon/>, que disponibiliza uma tabela de utilização de codões onde é apresentada a percentagem de uso de cada codão para os genes da espécie *Homo sapiens*. Desta forma, para cada mutação foi escolhida uma alteração de nucleótido que resultasse num aminoácido com uma natureza bioquímica diferente do original mas que ao mesmo tempo fosse codificado por um codão que apresentasse uma percentagem de uso elevada de modo a não afectar a eficiência de tradução da nova proteína tal como referido.

No caso das duas prolina nas posições 24 e 365, os seus codões correspondem à sequência de nucleótidos CCT, tendo sido o primeiro C substituído por um G em ambas, resultando num tripleto GCT que dá origem a uma alanina, com uma percentagem de utilização de 18,4%. Para além da boa percentagem de uso, a alanina não é um aminoácido muito reactivo, devido à limitada reactividade do grupo metilo em situações fisiológicas, sendo por isso uma opção quando se efectuam estudos de mutagénese dirigida destinados a revelar a função de um aminoácido mais reactivo. Apesar de tanto a prolina como a alanina serem ambos aminoácidos apolares, a prolina é bastante importante na estrutura tridimensional das proteínas, podendo assim esta troca influenciar a estrutura do TBCCD1.

Nas duas lisinas nas posições 292 e 295, o primeiro A das respectivas sequências AAA e AAG, foi substituído por um G em ambos os codões, dando origens aos tripletos GAA e GAG, que codificam o glutamato, com percentagens de uso de 29 e 39,6%, respectivamente. Como a lisina é um aminoácido básico, a escolha do glutamato incidiu no facto de este ser um aminoácido ácido, uma vez que a troca de aminoácidos de natureza oposta pode ajudar no estudo da função dos mesmos.

Em relação à arginina da posição 386, o primeiro C do codão CGT foi substituído por um T, sendo que o novo tripleto codifica uma cisteína com uma percentagem de uso de 10,6%. A arginina é também um aminoácido básico, enquanto a cisteína é um aminoácido polar neutro e tem um papel fundamental na manutenção da estrutura terciária de proteínas. Assim, como são dois aminoácidos com naturezas e funções opostas, a substituição do resíduo de arginina pelo de cisteína ajudará a determinar se esta arginina poderá estar envolvida ou não na hipotética actividade de GAP do TBCCD1.

Quadro IV.4. Codões alvo para a mutagênese dirigida no TBCCD1 e respectivos resíduos de aminoácidos codificados. Em cada codão correspondente ao resíduo de aminoácido escolhido procedeu-se à substituição de um nucleótido por outro, resultando no aparecimento de um novo resíduo de aminoácido no lugar do original.

Codão original	Aminoácido original	Posição	Codão alterado	Aminoácido inserido
CCT	Prolina	24	GCT	Alanina
AAA	Lisina	292	GAA	Glutamato
AAG	Lisina	295	GAG	Glutamato
CCT	Prolina	365	GCT	Alanina
CGT	Arginina	386	TGT	Cisteína

Para estudar as cinco mutações pontuais escolhidas, foi construída uma forma do gene que codifica para a proteína TBCCD1 para cada mutação, apresentando na sua sequência codificante a alteração nucleotídica desejada. Assim, cada sequência codificante de cada gene TBCCD1 mutado em apenas um nucleótido, foi clonada num vector de expressão de mamífero em fusão com o gene para a proteína fluorescente GFP no C-terminal.

IV.2.3 Caracterização por imunofluorescência nas células humanas HEK 293T e HeLa da expressão de formas da proteína TBCCD1 humana com mutações pontuais

Os cinco plasmídeos recombinantes construídos como acima descritos forma utilizados para transfectar células HEK 293T e HeLa, de modo a estas expressarem a proteína de fusão mutante e assim estudar a sua localização/função na célula.

Na figura IV.13., observa-se que a mutação na prolina conservada no motivo VxPx, em que este resíduo é substituído por um resíduo de alanina (mutação P24A), influencia a localização da γ -tubulina no centrossoma, havendo uma tendência para a diminuição da intensidade de marcação do centrossoma pelo anticorpo que reconhece esta proteína. Nas células HEK 293T

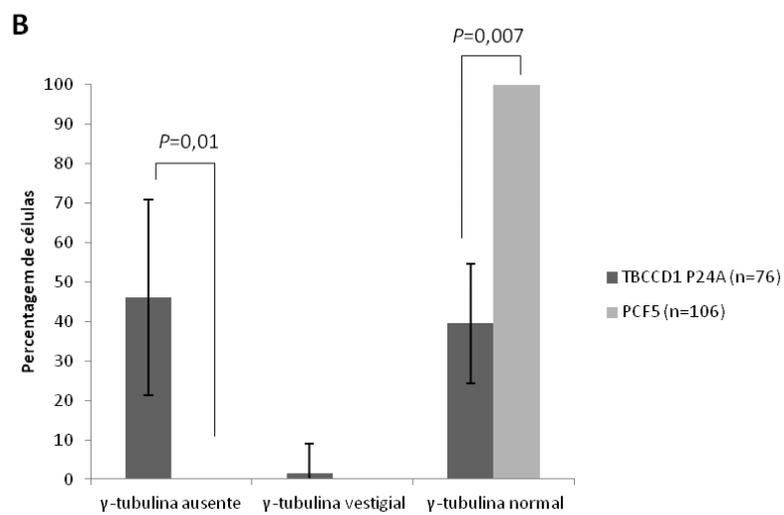
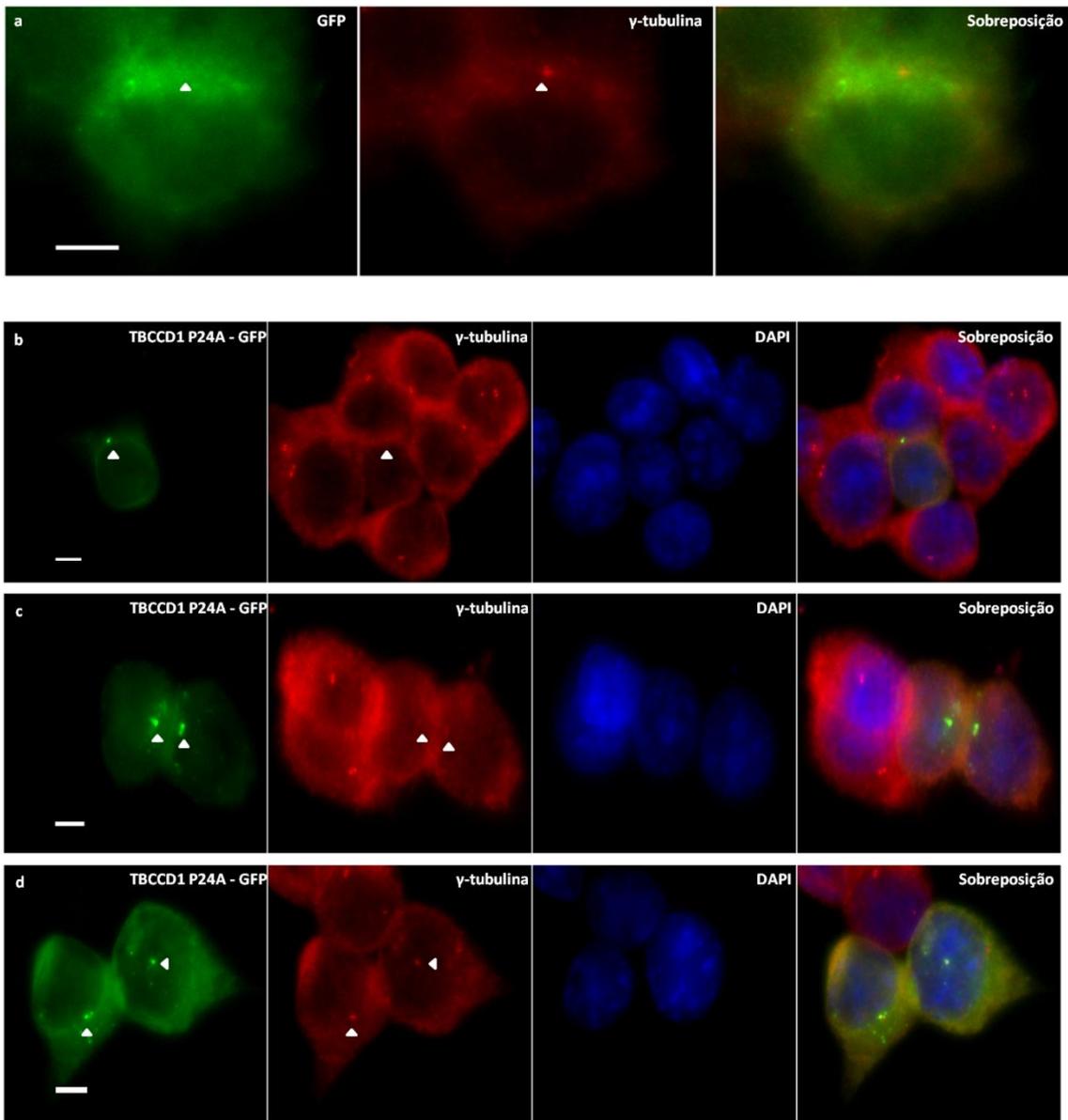
(figura IV.13. A) a mutação P24A tem vários efeitos na intensidade de marcação do centrossoma pelo anticorpo que reconhece a γ -tubulina. Na maioria das células, cerca de 50%, a construção TBCCD1 P24A parece causar uma perda dramática da γ -tubulina a partir do centrossoma (figura IV.13. Ab). No entanto, em cerca de 40% das células a γ -tubulina centrossomal era comparável aos níveis normais de expressão (figura IV.13 Ad). Apenas 1,5% das células apresentavam apenas uma redução nos níveis de expressão da γ -tubulina no centrossoma (figura IV.13. Ac). Assim, relativamente às células HEK 293T, observou-se um maior número de células em que há a perda de γ -tubulina do centrossoma, comparativamente com o controlo, em que 100% das células analisadas apresentavam níveis normais de γ -tubulina no centrossoma (figura IV.13. Aa e B). Esta diversidade de fenótipos relativamente a presença de γ -tubulina no centrossoma poderá ser explicada pelos diferentes níveis de TBCCD1 mutado que poderão ser expressos em cada célula transfectada e pela capacidade da proteína mutada competir com o TBCCD1 endógeno para o centrossoma.

Curiosamente, no caso das células HeLa (figura IV.13. C) não foi identificada nenhuma célula em que tenha ocorrido uma perda drástica da marcação da γ -tubulina no centrossoma. Porém, embora não se tenha procedido a uma quantificação da intensidade de fluorescência no centrossoma, observa-se que existe uma tendência para a maioria das células transfectadas apresentarem marcações para a γ -tubulina no centrossoma equivalentes (figura IV.13. Cb,d) ou mais fracas do que as células controlo (figura IV.13. Cc).

A análise das células 293T e HeLa transfectadas mostrou que é frequente observarem-se agregados da proteína mutada, sendo este fenómeno mais evidente nas células HeLa (figura IV.13. Cc,d) do que nas células HEK 293T. Estes agregados tendem a localizar-se maioritariamente na região em torno do centrossoma (figura IV.13. Cd). Estas observações poderão estar correlacionadas com as diferenças encontradas entre as duas linhas celulares acima referidas. De facto, nas células HeLa poderá especular-se que o *turnover* da proteína TBCCD1 no centrossoma poderá ser mais lento do que nas células HEK 293T, o que levaria a uma maior dificuldade do centrossoma incorporar a proteína TBCCD1 mutada por competição com a endógena. Deste modo, a proteína tenderia a acumular-se perto do centrossoma o que justificaria o aparecimento dos agregados. Tal agregação, pode dever-se provavelmente, ao facto de a proteína apresentar uma zona hidrófoba no início da sua região N-terminal, como já foi referido anteriormente. Além disso observou-se também que quanto maior o nível de transfecção das células, e conseqüente maior nível de sobreexpressão da proteína, o nível de agregação desta é também frequentemente maior, devido ao facto de a mutação afectar a estrutura tridimensional da proteína tornando-a assim insolúvel.

No seu conjunto os resultados sugerem que o TBCCD1 apresentando uma alanina na posição 24 em vez de uma prolina interfere com a localização da γ -tubulina no centrossoma levando a uma diminuição desta proteína neste centro organizador de microtúbulos. Deste modo é possível que os centrossomas que acomodam a proteína TBCCD1 mutada na prolina 24 tenham as suas funções afectadas, provavelmente a sua capacidade de nuclear microtúbulos. No entanto, esta sugestão carece de comprovação experimental. Os resultados obtidos com a forma mutada do TBCCD1 na prolina 24 constituem a primeira evidência de que no centrossoma o TBCCD1 poderá estar relacionado directa ou indirectamente com a presença da γ -tubulina nesta estrutura. É de lembrar que a prolina 24 que é mutada se encontra próxima do local proteolítico putativo (figura IV.2.), mas mais do que isso a substituição desta prolina poderá afectar dramaticamente a estrutura tridimensional do TBCCD1 nesta região onde se encontram os primeiros 20 resíduos de aminoácidos que desempenham um papel crítico na sua localização centrossomal (figura IV.5.).

A – HEK 293T



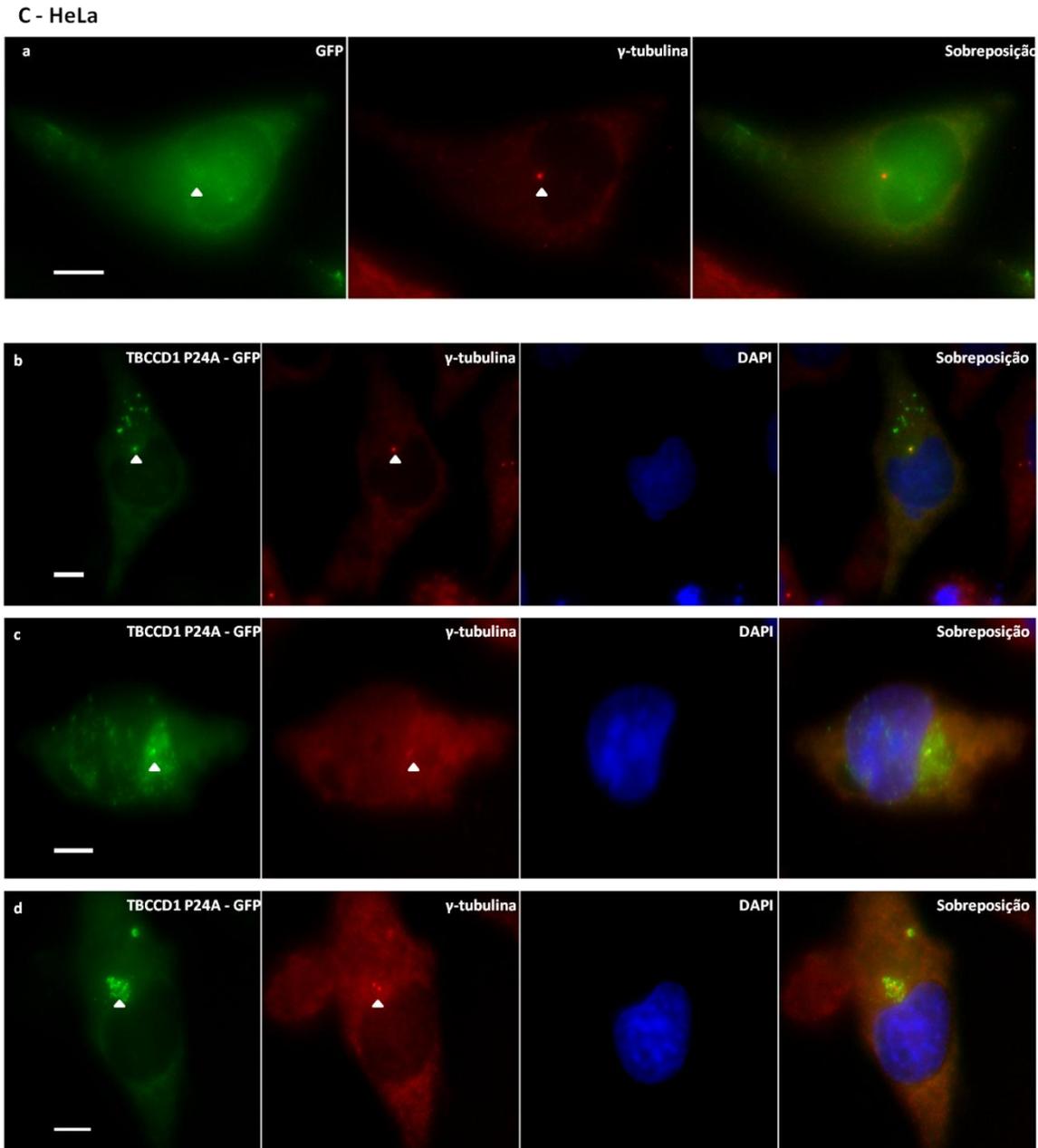


Figura IV.13. Análise de imunofluorescência indirecta da proteína TBCCD1 humana com a mutação pontual P24A em células de mamífero através da expressão de proteínas de fusão com proteínas fluorescentes. (A) Células HEK 293T a expressar a proteína fluorescente GFP (a) e a proteína TBCCD1 P24A (b, c, d) em fusão com GFP foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. (Aa) As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. (Ab) As cabeças das setas apontam para a proteína de fusão nos centrosomas e para a ausência da γ -tubulina nesta estrutura; (Ac) As cabeças das setas apontam para a proteína de fusão nos centrosomas e para a diminuição da marcação de γ -tubulina nesta estrutura; (Ad) As cabeças das setas apontam para a proteína de fusão e γ -tubulina nos centrosomas, semelhante às células controlo. Os resultados apresentados para as células HEK 293T são representativos de um total de quatro experiências independentes para a proteína TBCCD1 P24A e três

para a proteína GFP. **(B)** Representação gráfica da expressão da γ -tubulina no centróssoma em células HEK 293T. Os valores representam a percentagem (\pm desvio padrão) de células presentes nas várias categorias. O valor de n corresponde ao número de células contadas num total de duas experiências independentes para células transfectadas com o vector PCF5 (apenas expressando a proteína GFP) e quatro células a expressar o TBCCD1-GFP P24A. As diferenças obtidas são estatisticamente significativas de acordo com o teste *t-student*, excepto para a categoria γ -tubulina vestigial ($P=0,06$). **(C)** Células HeLa a expressar a proteína fluorescente GFP **(a)** e a proteína TBCCD1 P24A **(b, c, d)** em fusão com GFP foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. **(Ca)** As cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centróssomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. **(Cb-d)** As cabeças das setas apontam para a proteína de fusão e γ -tubulina nos centróssomas. Estes resultados para as células HeLa são representativos de duas experiências independentes. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

Através da análise dos resultados apresentados nas figuras IV.14., IV.15., IV.16. e IV.17. constatou-se que no caso das restantes quatro mutações introduzidas na proteína TBCCD1 (quadro IV.4.), K292E, K295E, P365A e R386C, os fenótipos identificados nas células transfectadas a expressar as proteínas mutantes foram idênticos entre si, não se tendo observado qualquer alteração relativamente à marcação do centróssoma pelo anticorpo para a γ -tubulina. As quatro mutações pontuais também não provocaram alterações na localização da proteína TBCCD1 mutada, uma vez que esta continua a apresentar uma *pool* centróssomal e uma *pool* citoplasmática. Também não se observaram diferenças na posição do centróssoma relativamente ao núcleo.

No caso da troca de um resíduo de lisina por um de glutamato em ambas as mutações no motivo KRAK da proteína TBCCD1, os resultados sugerem que os dois resíduos de lisina deste motivo não são essenciais para a localização e aparentemente para a função do TBCCD1, pelo menos numa situação em que a proteína endógena também se encontra presente. No entanto, estes resultados não permitem afastar a importância destes dois resíduos de lisinas no motivo KRAK para a localização do TBCCD1 no cílio primário e/ou para a sua biogénese, assunto que será alvo de análise na secção IV.3 deste capítulo.

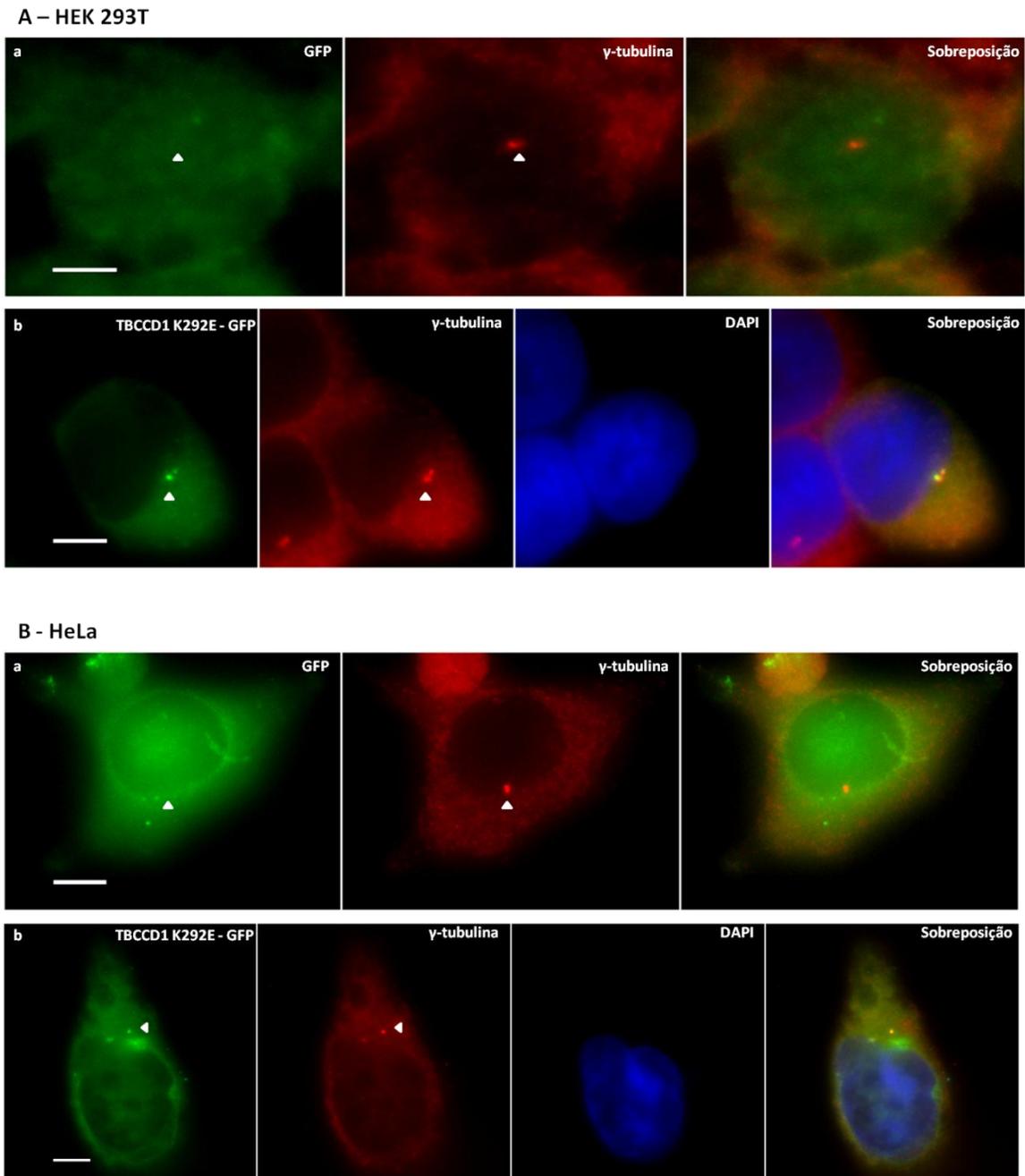
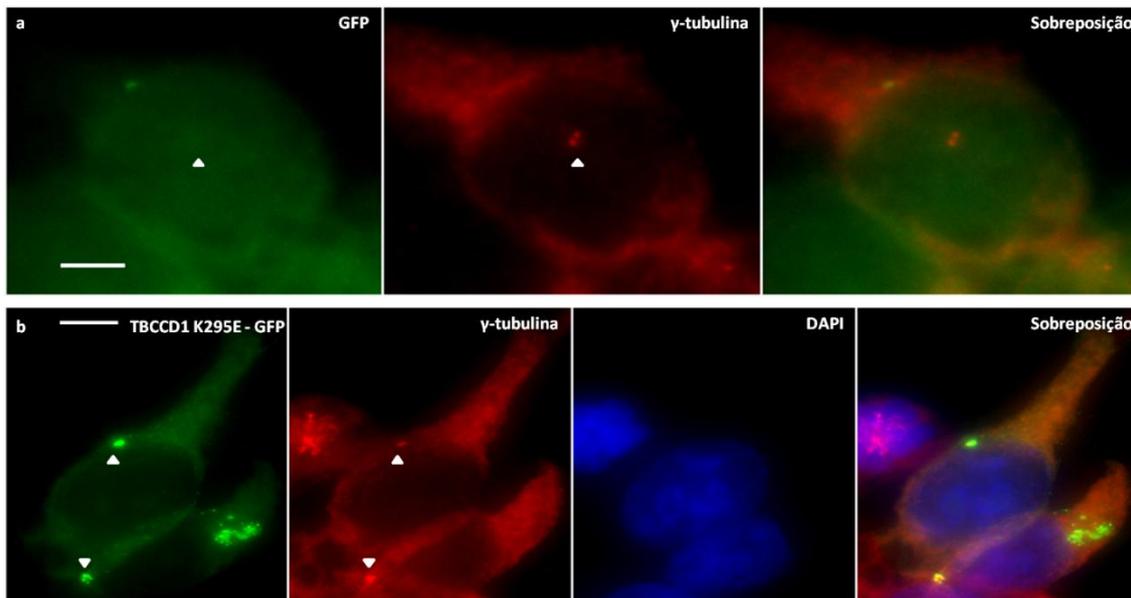


Figura IV.14. Análise de imunofluorescência indirecta da proteína TBCCD1 humana com a mutação pontual K292E em células de mamífero através da expressão da proteína de fusão com a proteína fluorescente GFP. (A) Células HEK 293T a expressar a proteína fluorescente GFP (a) e a proteína de fusão TBCCD1-GFP (b) possuindo a mutação K292E foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em a as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em b as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 K292E e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados são representativos de um total de três experiências independentes para a proteína GFP e

duas para a proteína TBCCD1 K292E-GFP. **(B)** Células HeLa a expressar a proteína fluorescente GFP **(a)** e a proteína de fusão TBCCD1-GFP **(b)** possuindo a mutação K292E foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em **a** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em **b** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 K292E e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados provêm de uma experiência independente para a proteína TBCCD1 K292E-GFP e duas para a proteína GFP. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

A – HEK 293T



B - HeLa

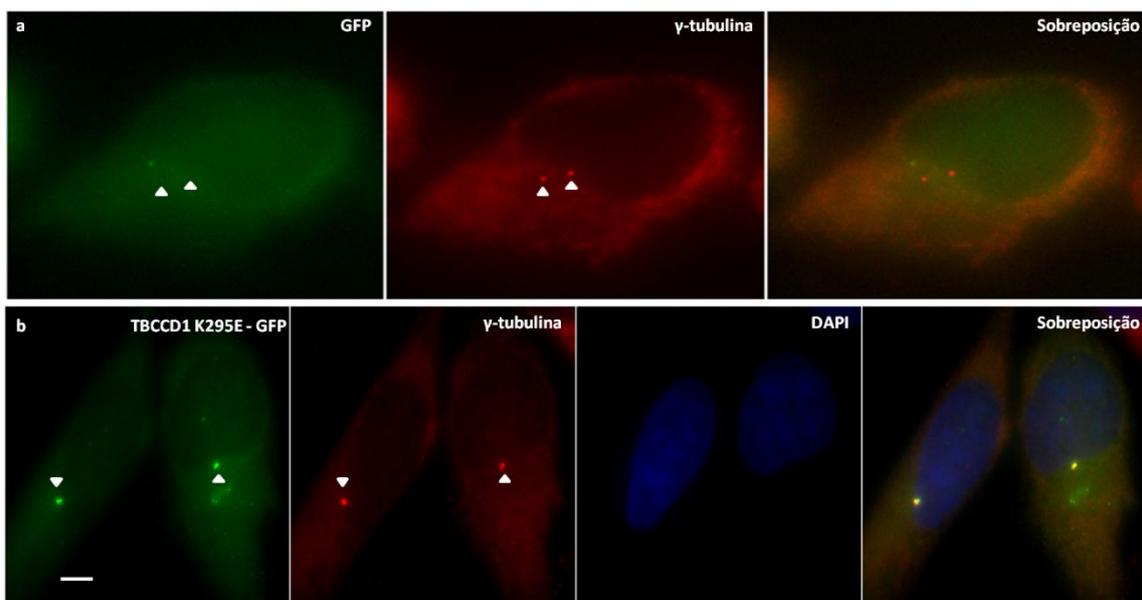
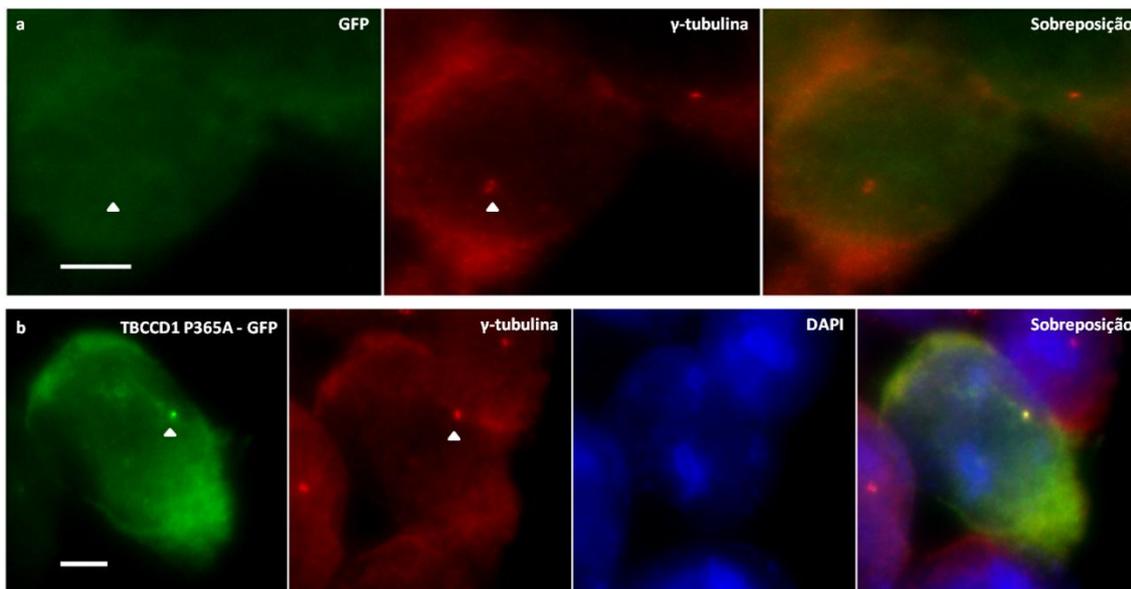


Figura IV.15. Análise de imunofluorescência indirecta da proteína TBCCD1 humana com a mutação pontual K295E em células de mamífero através da expressão da proteína de fusão com a proteína fluorescente GFP. **(A)** Células HEK 293T a expressar a proteína fluorescente GFP **(a)** e a proteína de fusão TBCCD1-GFP possuindo a mutação K295E **(b)** foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em **a** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em **b** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 K295E e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados são representativos de um total de três experiências independentes para a proteína GFP e

uma única experiência para a proteína TBCCD1 K295E-GFP. **(B)** Células HeLa a expressar a proteína fluorescente GFP **(a)** e a proteína de fusão TBCCD1-GFP possuindo a mutação K295E **(b)** foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. . Em **a** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em **b** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 K295E e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados provêm de um total de duas experiências independentes para a proteína GFP e uma única experiência para a proteína TBCCD1 K295E-GFP. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

Os resultados obtidos no caso da mutação em que a prolina na posição 365 do TBCCD1 foi substituída pela alanina (quadro IV.4.) sugerem que o resíduo de prolina na posição 365 do TBCCD1, conservado entre as três proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1 não é fundamental para a localização e aparentemente para a função do TBCCD1. Contudo, dado que a análise dos efeitos da proteína TBCCD1 mutante foi limitada, não é possível afastar definitivamente que esta mutação introduzida na proteína TBCCD1 possa afectar a função do TBCCD1 noutras situações que não as analisadas ou mesmo se a proteína TBCCD1 endógena não estivesse de todo presente.

A – HEK 293T



B - HeLa

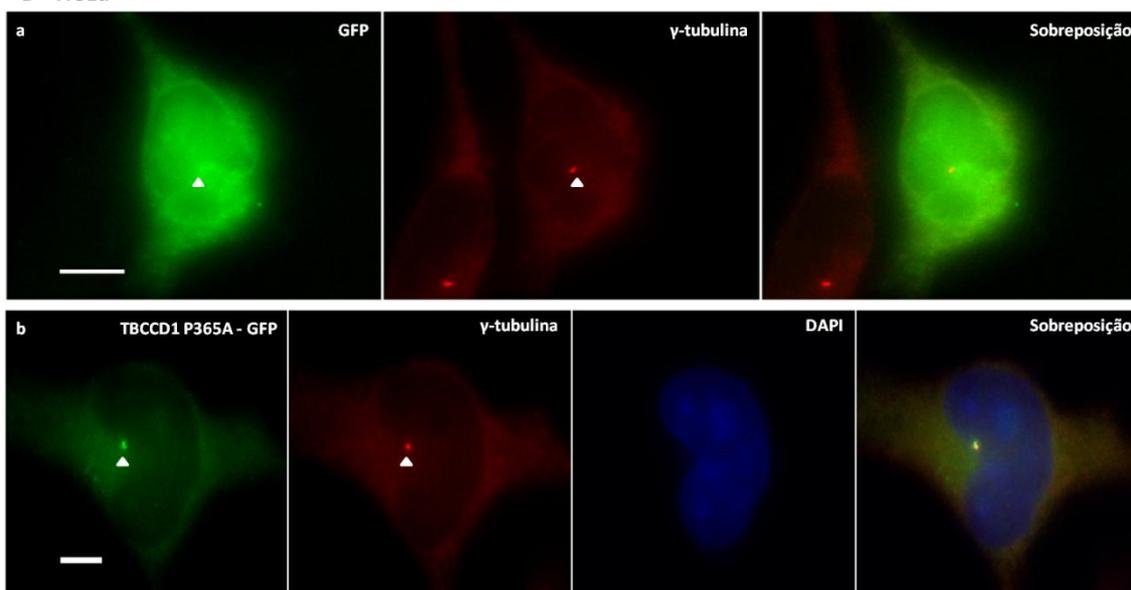
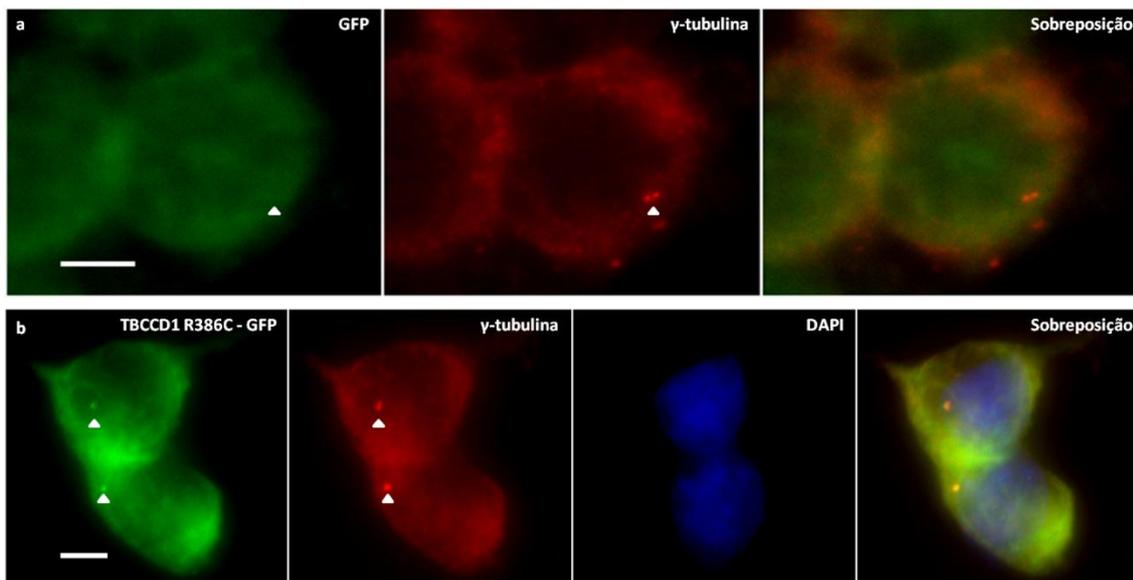


Figura IV.16. Análise de imunofluorescência indirecta da proteína TBCCD1 humana com a mutação pontual P365A em células de mamífero através da expressão da proteína de fusão com a proteína fluorescente GFP. (A) Células HEK 293T a expressar a proteína fluorescente GFP **(a)** e a proteína de fusão TBCCD1-GFP possuindo a mutação P365A **(b)** foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em **a** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em **b** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 P365A e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados são representativos de um total de três experiências independentes para a proteína GFP e uma para a proteína TBCCD1 P365A-GFP. **(B)** Células HeLa a expressar a proteína fluorescente GFP **(a)** e a proteína de fusão TBCCD1-GFP possuindo a mutação P365A **(b)** foram processadas para análise de

imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em **a** as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em **b** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 P365A e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados provêm de duas experiências independentes para a proteína GFP e uma única experiência tanto para a proteína TBCCD1 P365A-GFP. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

A mutação na arginina na posição 386, resíduo com possível actividade GAP, por troca com um resíduo de cisteína, revelou que este resíduo de arginina não parece ser crítico para a função e/ou localização do TBCCD1. Mais ainda, se a hipotética função GAP do TBCCD1 for requerida para o seu envolvimento na ligação do centrosoma ao núcleo, então este resíduo não parece ser crítico uma vez que o posicionamento do centrosoma nas células transfectadas a expressar a proteína mutante não é afectado. Porém, mais uma vez a importância deste resíduo poderá a estar a ser mascarada pela presença do TBCCD1 endógeno. Por outro lado, estes resultados vêm de encontro ao que já foi demonstrado anteriormente por Gonçalves e colaboradores e sugerem que a proteína TBCCD1 não possuirá actividade GAP para a β -tubulina, como as proteínas TBCC e RP2, e consequentemente não partilhará funções com estas proteínas. No entanto, serão necessárias mais experiências para excluir definitivamente a hipótese de que o TBCCD1 não possui actividade de GAP.

A – HEK 293T



B - HeLa

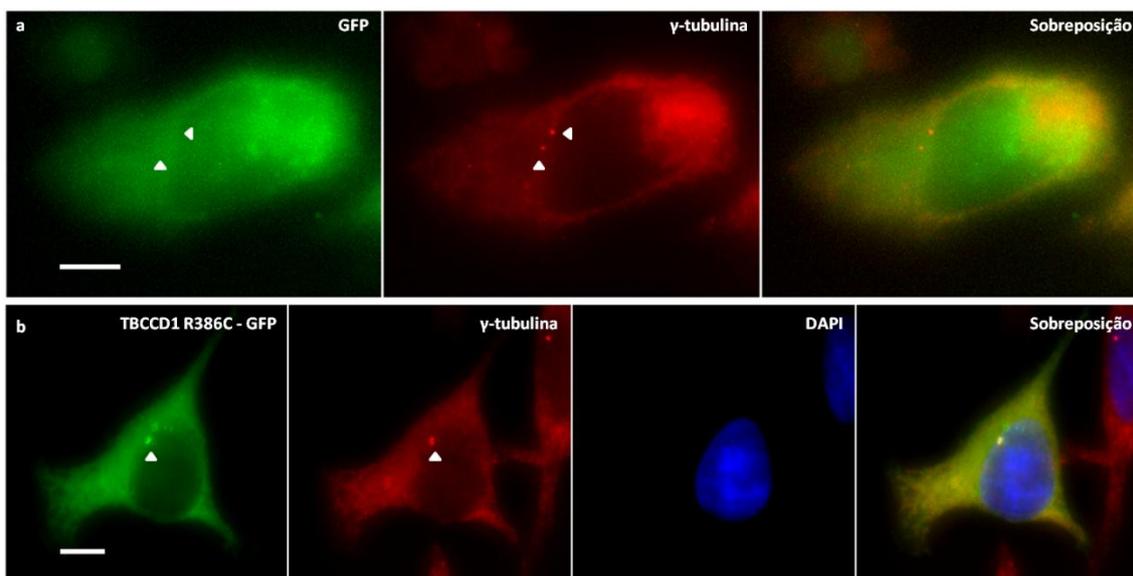


Figura IV.17. Análise de imunofluorescência indirecta da proteína TBCCD1 humana com a mutação pontual R386C em células de mamífero através da expressão de proteína de fusão com a proteína fluorescente GFP. (A) Células HEK 293T a expressar a proteína fluorescente GFP (a) e a proteína de fusão TBCCD1-GFP possuindo a mutação R386C (b) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. Em a as cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em b as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 R386C e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados são representativos de um total de três experiências independentes para a proteína GFP e uma única experiência para a proteína TBCCD1 R386C-GFP. **(B)** Células HeLa a expressar a proteína fluorescente GFP (a) e a proteína de fusão TBCCD1-GFP possuindo a mutação R386C (b) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra γ -tubulina. . Em a as

cabeças das setas apontam para a γ -tubulina nos centrosomas e para a ausência da proteína GFP nesta estrutura. Em **b** as cabeças das setas apontam para o TBCCD1 R386C e para a γ -tubulina nos centrosomas. Os resultados apresentados provêm de duas experiências independentes para a proteína GFP e uma única experiência para a proteína TBCCD1 R386C-GFP. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m.

É de realçar que, de igual modo com já foi observado anteriormente, com a transfecção em células de mamífero de todos estes clones da proteína TBCCD1 com mutações, se observou uma agregação da proteína no citoplasma, principalmente na zona da célula onde o centrosoma se encontra, particularmente à volta deste organelo. Além disso, a agregação é também mais evidente nas células HeLa do que nas células 293T.

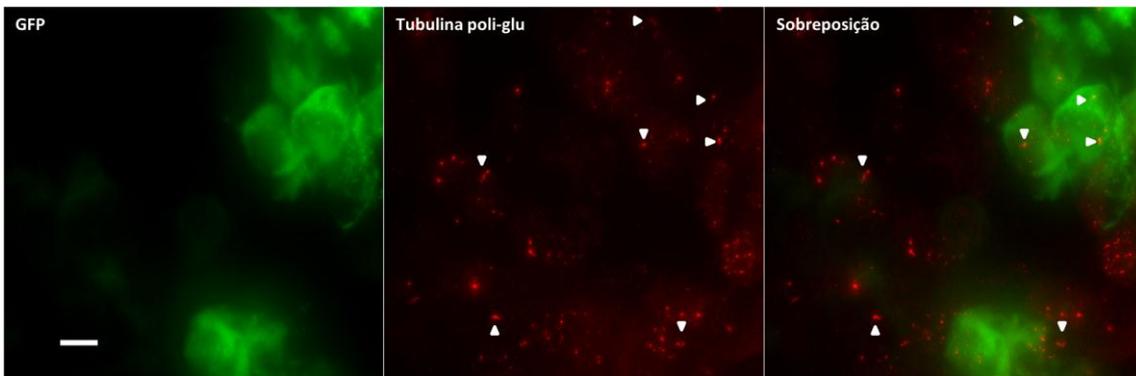
IV.3 Estudo do papel da proteína TBCCD1 humana na ciliogénese

Uma das funções do centrosoma é sua capacidade de se transformar em corpo basal e ser capaz de montar cílios primários. O TBCCD1, tal como referido anteriormente, localiza-se no centrosoma mas também no corpo basal de cílios primários e motores. A localização do TBCCD1 no corpo basal dos cílios primários e motores poderá ser devida ao facto desta proteína possuir dois domínios candidatos a estarem envolvidos nesta localização: os motivos VxPx e KRAK. Os efeitos de alterar resíduos de aminoácidos nestes motivos foram já estudados neste trabalho ao nível da função do TBCCD1, da sua localização no centrosoma e da presença de γ -tubulina neste organelo. Assim, como o TBCCD1 é uma proteína importante para a ciliogénese, uma vez que o silenciamento do gene *tbccd1* leva a uma diminuição da eficiência das células epiteliais humanas RPE-1 para montar cílios primários (Gonçalves et al., 2010a), é também importante que se estude o impacto de alterações na sequência de resíduos de aminoácidos destes motivos a nível da biogénese de cílios primário.

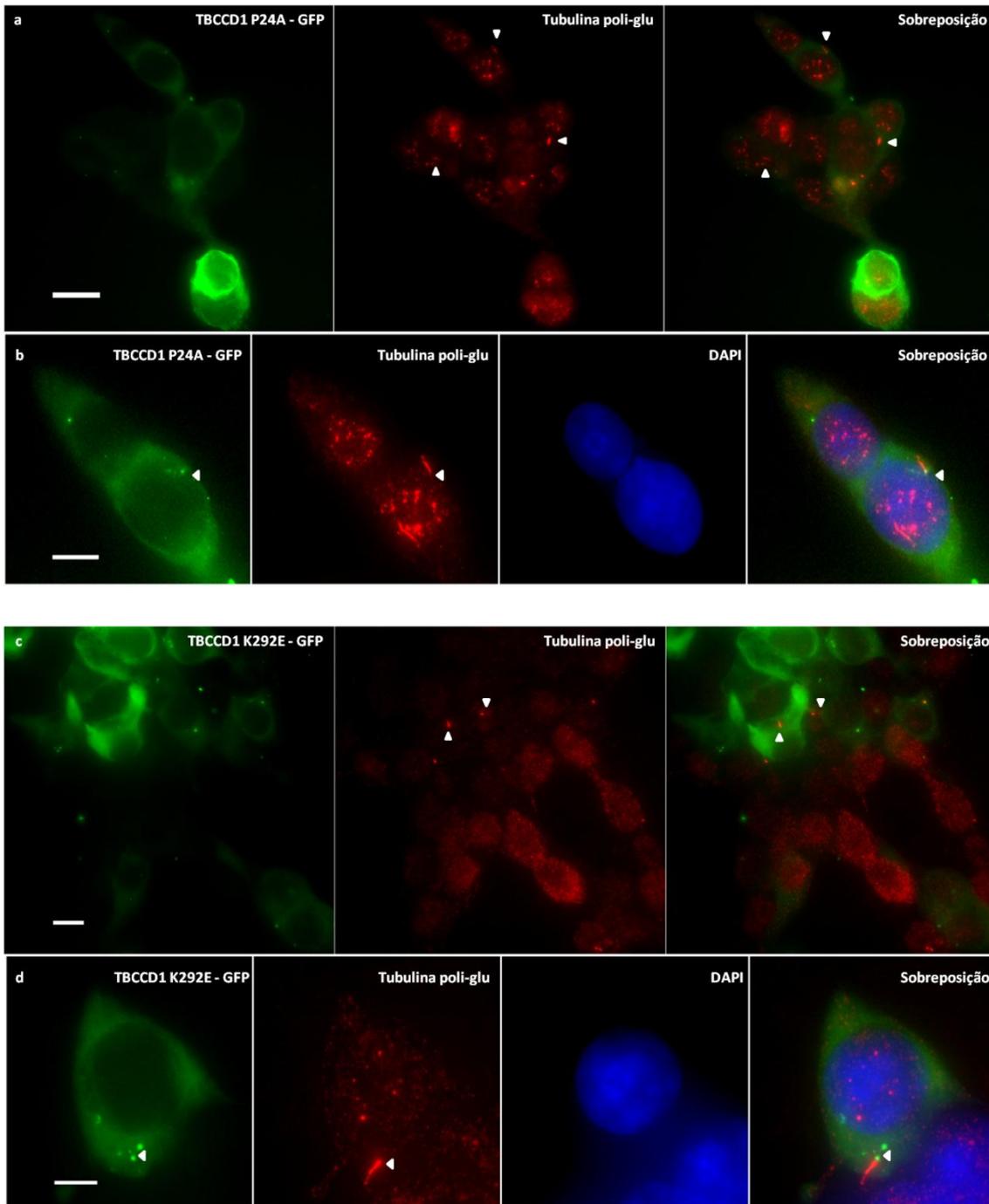
IV.3.1 Impacto na ciliogénese das mutações P24A, K292E e K295E na proteína TBCCD1 humana

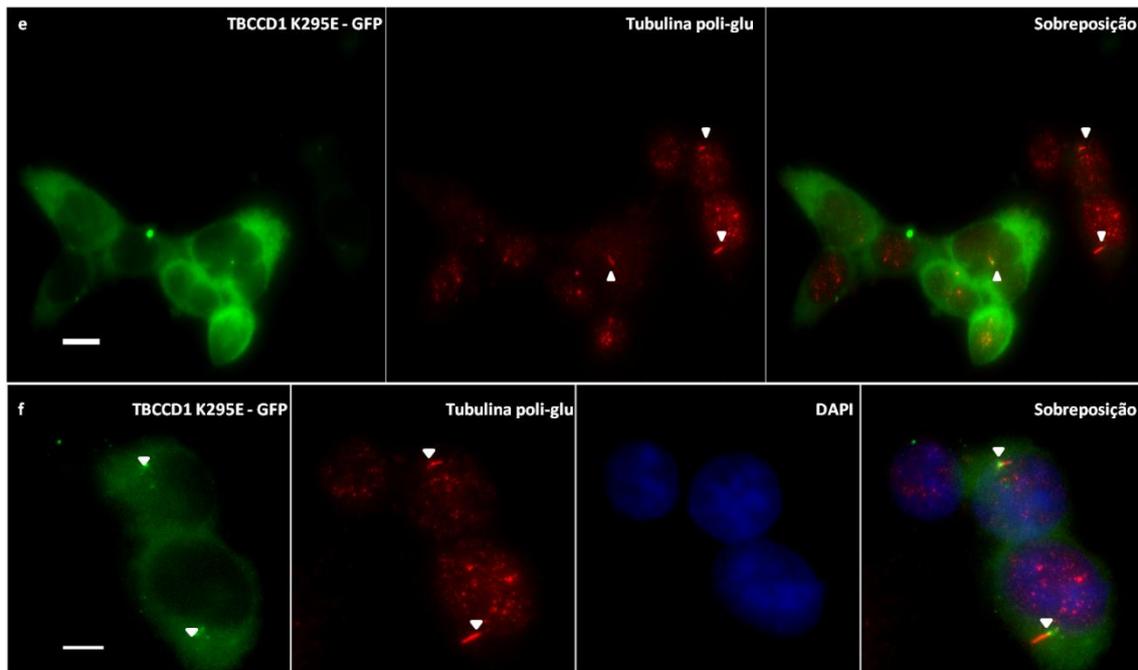
As três mutações P24A, K292E e K295E (ver quadro IV.4.) produzidas na proteína TBCCD1 e analisadas anteriormente e que se localizam nos motivos descritos como responsáveis pela localização de proteínas no cílio, VxPx e KRAK, foram novamente estudadas, mas no que diz respeito ao seu impacto na ciliogénese. As células HEK 293T são bastante eficientes a produzir cílios primários, desde que estejam confluentes e que lhes seja removido o soro durante 48h o que as leva a entrar em G0. Assim, as células foram semeadas antes da transfecção e deixadas atingir a confluência. De seguida os três plasmídeos recombinantes foram transfectados em células HEK 293T e o soro foi removido às células após cerca de 3 horas de expressão dos plasmídeos. As células foram deixadas sem soro durante 48 horas e após este período foram processadas para imunofluorescência indirecta com um anticorpo anti-tubulina poliglutamilada (GT335), uma vez que esta modificação pós-traducional da tubulina é abundante nos cílios.

A – HEK 293T



B – HEK 293T





C

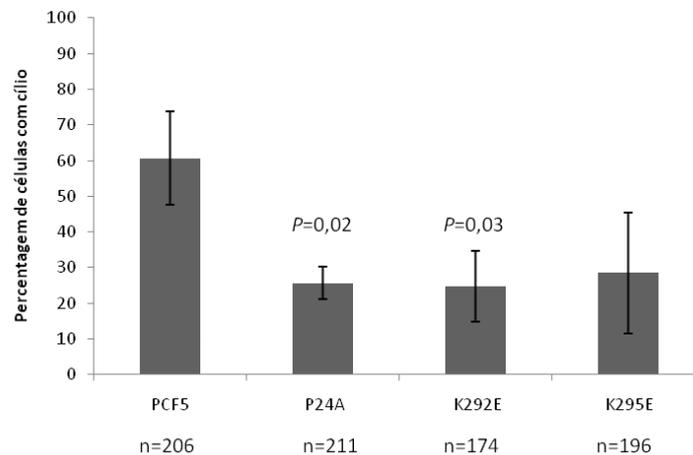


Figura IV.18. Impacto na ciliogênese das mutações P24A, K292E e K295E na proteína TBCCD1 humana.

(A) Células HEK 293T a expressar a proteína fluorescente GFP foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra tubulina poli-glutamilada (GT335) com 48h de privação de soro para induzir a produção de cílios primários. As cabeças das setas apontam os cílios primários em células transfectadas. A barra de escala corresponde a 10 μ m. **(B)** Células HEK 293T a expressar a proteína de fusão TBCCD1-GFP possuindo as mutações P24A (**a** e **b**), K292E (**c** e **d**) e K295E (**e** e **f**) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com o anticorpo contra a tubulina poli-glutamilada (GT335) com 48h de privação de soro para induzir a produção de cílios primários. As cabeças das setas apontam para os corpos basais dos cílios primários de células transfectadas. O DNA foi marcado com DAPI. Em **a**, **c** e **e** as barras de escala correspondem a 10 μ m, enquanto em **b**, **d** e **f** correspondem a 5 μ m. **(C)** Representação gráfica da percentagem (\pm desvio padrão) de células com cílio

nas populações de células controlo a expressar GFP, por estarem transfectadas com o plasmídeo PCF5, ou a expressar as formas mutadas TBCCD1 P24A, K292E e K295E. O valor de n corresponde ao número de células com cílio contadas num total de duas experiências independentes para o PCF5, três para o TBCCD1 P24A, três para o TBCCD1 K292E e duas para o TBCCD1 K295E. As diferenças obtidas são estatisticamente significativas de acordo com o teste *t-student*, excepto para a população das células a expressar o TBCCD1 K295E ($P=0,2$).

Contrariamente à população controlo a expressar GFP (figura IV.18. A) em que em grande número das células apresentava cílio (cerca de $60,7\% \pm 13,2$), nas células a expressar as formas da proteína TBCCD1 com as mutações P24A, K292E e K295E observou-se uma diminuição do número de células com cílios (figura IV.18 B), apresentando estas cerca de $25,6\% (\pm 4,5)$, $24,7\% (\pm 9,9)$ e $28,6\% (\pm 17)$ de células transfectadas com cílios, respectivamente (figura IV.18 C). No caso do TBCCD1 K295E os resultados não são estatisticamente significativos, ao contrário dos outros dois, TBCCD1 P24A e K292E. No entanto, não se identificaram diferenças significativas na quantidade de cílios entre as células que expressavam cada uma das três proteínas mutadas. Assim, quando as células estão a expressar estas formas mutantes do TBCCD1 a população apresenta menos cílios primários. Contudo, a proteína TBCCD1 mutada é capaz de se localizar nos centrossomas e em alguns corpos basais que apresentam cílios primários. Estes dados sugerem que as formas mutadas do TBCCD1, ou vão menos eficientemente para os corpos basais, o que justificaria a queda no número de cílios, ou alternativamente as proteínas mutadas teriam a capacidade de estar/ir para os corpos basais mas aí a sua função se encontraria comprometida o que impediria a montagem do cílio. Deste modo torna-se inconclusivo se estes motivos e respectivas mutações se encontram envolvidas na localização no corpo basal /cílio ou ao provocarem alterações críticas na estrutura tridimensional da proteína afectarão a sua função requerida para a ciliogénese. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos com o silenciamento do TBCCD1 por RNAi, onde existe também a diminuição do número de cílios nas células (Gonçalves et al., 2010).

A heterogeneidade de fenótipos observada poderá estar relacionada com a razão proteína mutada versus proteína selvagem, podendo assim mascarar possíveis alterações. Também não é possível estabelecer se a proteína TBCCD1 estará directamente envolvida no processo da ciliogénese ou se a menor eficiência na produção de cílios das células transfectadas com as proteínas mutadas será um efeito indirecto.

V – Discussão de Resultados

Nas células animais o centrossoma está posicionado no centro da célula em estreita associação com o núcleo. Os mecanismos responsáveis por este processo não estão ainda completamente compreendidos. A proteína humana TBCCD1 foi recentemente caracterizada, tendo-se verificado que se localiza no centrossoma, no fuso mitótico, no corpo médio e no corpo basal de cílios primários e motores. O silenciamento da proteína TBCCD1 nas células RPE-1 provoca a dissociação do centrossoma do núcleo e a desorganização do complexo de Golgi. As células silenciadas são maiores, menos eficientes na montagem de cílios primários e a sua migração é mais lenta. No entanto, a função do centrossoma na nucleação de microtúbulos não é afectada pelo silenciamento do TBCCD1. Este estudo sugeriu que o TBCCD1 é uma proteína chave na regulação do posicionamento do centrossoma e consequentemente na organização interna da célula (Gonçalves et al., 2010a).

V.1 Estudo da região N-terminal da proteína TBCCD1 humana

O mesmo estudo acima referido mostrou que a região N-terminal era responsável pela localização centrossomal da proteína TBCCD1 humana (Gonçalves et al., 2010a), não tendo sido determinado qual o domínio mínimo nesta região crítico para a localização. Assim, a localização centrossomal da proteína TBCCD1 humana foi avaliada através do estudo da região N-terminal da mesma para se determinar qual o domínio mínimo respectivo. Verificou-se então que as três proteínas TBCCD1 criadas com deleções na sua extremidade N-terminal (TBCCD1 Δ 20, Δ 131 e Δ 230) não se localizavam no centrossoma, sendo a sequência correspondente aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína de extrema importância para a localização centrossomal da mesma (figura IV.4.). Com a obtenção destes resultados a localização do domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 foi também testada por microscopia de imunofluorescência e observou-se que este domínio sozinho se localiza no centrossoma, sendo por isso o domínio crítico que determina a localização da proteína neste organelo (figura IV.5.).

Estes resultados no seu conjunto sugerem fortemente que este domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 constitui um *centrosome targeting motif*, ou seja, um domínio específico existente em certas proteínas centrossomais e que é responsável pela localização destas no centrossoma. Um dos *centrosome targeting motif* conhecidos é o domínio PACT (*pericentrin_AKAP450_centrosomal targeting*), identificado e conservado na região C-terminal das proteínas AKAP450 e pericentrina, proteínas centrossomais envolvidas no recrutamento de componentes estruturais e reguladores para o centrossoma. A sobreexpressão do domínio PACT da proteína AKAP2450 provoca o deslocamento da pericentrina endógena do centrossoma, sugerindo que ambas são recrutadas para o mesmo local no centrossoma, ocorrendo a ligação através do domínio PACT (Gillingham & Munro, 2000; Nishimura et al., 2005). Não foi demonstrado se o mesmo fenómeno acontece para a proteína TBCCD1, assim seria interessante observar, por microscopia de imunofluorescência das células transfectadas com os 20 primeiros aminoácidos por da região N-terminal da proteína ligados ao GFP com o anticorpo contra o TBCCD1, se a marcação da proteína TBCCD1 no centrossoma diminui.

Outro *centrosome targeting motif* identificado é o domínio TACC, existente nas proteínas TACC (*transforming acidic coiled coil*), uma família de proteínas que possuem uma função relacionada com a organização dos microtúbulos. O motivo TACC é um domínio *coiled-coil* localizado na região C-terminal das proteínas TACC (Gergely et al., 2000). Assim como as proteínas anteriores, a proteína centrossomal nineína também possui o seu *centrosome targeting motif* na região C-terminal, não correspondendo a nenhum domínio conhecido. Para além disso, também não foi encontrada nenhuma outra proteína centrossomal que apresentasse homologia com o *centrosome targeting motif* da nineína, indicando que proteínas centrossomais diferentes podem possuir *centrosome targeting motif* diferentes (Chen et al., 2003). Nos casos do domínio PACT (Gillingham & Munro, 2000) e do domínio da proteína nineína (Chen et al., 2003), estes são suficientes para conferir uma localização centrossomal à proteína GFP, sendo então responsáveis pela localização das proteínas neste organelo, resultado idêntico ao observado para o TBCCD1 no caso dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal. O cofactor da tubulina TBCD possui também dois domínios responsáveis pela sua localização no centrossoma, *centrosome localization domains* 1 e 2 (CLD1, resíduos 311-610; CLD2, resíduos 803-1054), sendo que a sobre-expressão de cada um deles isoladamente resulta na perda no centrossoma de γ -tubulina, GDP-WD, pericentrina e, no caso do CLD2, da centrina-2 (Cunningham & Kahn, 2008). O possível *centrosome targeting motif* da proteína TBCCD1 humana, o domínio composto pelos primeiros 20 resíduos

de aminoácidos da extremidade N-terminal, diferencia-se assim de todas estas proteínas descritas visto que, ao contrário das mesmas, não se localiza na região C-terminal mas sim na N-terminal.

V.2 Comparação das sequências de resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 de diferentes espécies

A hipótese de o domínio constituído pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 constituir um *centrosome targeting motif* é apoiada pelo facto de este domínio estar conservado entre os TBCCD1 de várias espécies do reino *animalia*, maioritariamente nos vertebrados, o que se verificou pelo alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos destas proteínas (figura IV.6.). Esta comparação entre as sequências dos 20 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal dos TBCCD1 mostra ainda que provavelmente este domínio está relacionado com a especialização da função da proteína TBCCD1 no centróssoma de células animais, especialmente nos vertebrados. De facto, a alga *Chlamydomonas reinhardtii* não apresenta este domínio conservado na sua sequência, apesar de possuir corpos basais, estando a proteína localizada nestes organelos (Feldman & Marshall, 2009). Mais ainda, o TBCCD1 também está presente em plantas que possuem formas ciliadas/flageladas no seu ciclo de vida, como é o caso da Briófito *Physcomitrella patens*, cuja sequência foi utilizada no alinhamento de sequências do TBCCD1, apresentadas na figura IV.6. Este facto e o facto de a proteína TBCCD1 se apresentar em diferentes organismos distribuídos ao longo da escala filogenéticas, sugere que o ancestral comum fosse já uma proteína “centriolar” presente em centróssomas/corpos basais. De facto, um estudo recente propôs que os vários grupos de eucariotas possuem um organismo ancestral comum flagelado, uma vez que em todos estes grupos de organismos eucariotas há presença de corpos basais/flagelos (Carvalho-Santos et al., 2010). Neste contexto, investigou-se se a proteína TBCCD1 da planta *Arabidopsis thaliana* seria capaz de se localizar no centróssoma de células animais, apesar de esta proteína não apresentar os 20 resíduos de aminoácidos conservados e de a *Arabidopsis thaliana* não possuir centróssomas/centríolos. Se esta localização ocorresse, mostraria que apesar das células de *Arabidopsis thaliana* terem perdido os centróssomas/centríolos, a proteína encerraria ainda informação para aí se localizar. A ausência da localização do TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* sugeriu por sua vez que a função crítica da proteína das células eucariotas vai para além da estrutura do centróssoma, sendo

mais provável que esteja relacionado com as suas funções como centro organizador de microtúbulos.

Verificou-se então que a sobreexpressão da proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* em fusão com a GFP, não se localiza no centrossoma das células HEK 293T (figura IV.7.). Estes resultados indicam que a presença da proteína TBCCD1 em vários organismos não está directamente relacionada com presença de centrossomas/corpos basais. Deste modo a proteína poderá desempenhar um papel importante na célula fora do centrossoma ou alternativamente a sua função ser fundamental para o funcionamento dos centros organizadores de microtúbulos, possuam eles ou não centríolos na sua estrutura. Apoiando fortemente esta última hipótese, está o facto do TBCCD1 se localizar em oócitos de rato, que não possuem centrossomas, nos centros organizadores de microtúbulos (Stéphane Brunet, comunicação pessoal).

V.3 Estudo dos domínios funcionais CARP e TBCC na proteína TBCCD1 humana

No entanto, apesar do domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1 ser crítico para a localização da proteína no centrossoma, quando se estudou a região C-terminal da proteína pela deleção de parte desta região, que inclui os dois domínios funcionais CARP e TBCC (TBCCD1 Δ CARP+TBCC), a proteína não se localizou no centrossoma, mesmo possuindo a sequência da extremidade da região N-terminal (figura IV.9.). O facto de a deleção de parte da região C-terminal do TBCCD1 levar a uma deslocalização da proteína do centrossoma, sugere que a localização centrossomal da proteína depende simultaneamente da presença dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos e da presença dos domínios CARP e TBCC na região C-terminal. No caso da proteína centrossomal ALMS1, esta possui o domínio que é responsável pela sua localização no centrossoma na região C-terminal, no entanto esta localização é dependente da interacção com outras regiões da proteína. Isto sugere que o recrutamento eficiente do domínio para o centrossoma não envolve a ligação através de um pequeno motivo apenas, mas requer a interacção de vários motivos da estrutura da proteína (Knorz et al., 2010). O mesmo pode ocorrer na proteína TBCCD1 e desta forma é possível especular que, ou a interacção do domínio N-terminal com a região C-terminal é requerida para levar a proteína para o

centrossoma, ou alternativamente um dos domínios ou mesmo a sua interacção poderá ser necessário para reter/manter a proteína nesta estrutura.

Curiosamente, a sobreexpressão do TBCCD1 que perdeu a região C-terminal e dos domínios funcionais CARP e TBCC leva também à acumulação desta proteína no núcleo (ver figuras IV.9. e IV.10.) que não corresponde a uma localização natural da proteína TBCCD1 selvagem nas mesmas condições. Esta localização ocorre por vezes de forma heterogénea observando-se a sua acumulação em certas regiões do núcleo. É de referir que a proteína RP2, relacionada com o TBCCD1, também aparece localizada no núcleo apenas quando as células são submetidas a um tratamento com agentes que provocam danos no DNA induzindo stress oxidativo, principalmente a radiação UV (Yoon et al., 2006). Como referido anteriormente, a RP2 é uma proteína associada à membrana plasmática e que possui na região C-terminal um domínio NDPk (*nucleoside diphosphate kinase*), presente também nos enzimas NDK. A proteína NDK1 humana foi descrita recentemente como possuindo a actividade de exonuclease 3'-5', sendo que a presença do domínio NDPk em ambas as proteínas sugere a presença desta actividade na proteína RP2. Verificou-se que a RP2 é uma proteína de ligação ao DNA que apresenta actividade de exonuclease 3'-5', com preferência para DNA de cadeia simples ou de cadeia dupla com porções de cadeia simples na extremidade 3'. A observação de que a RP2 é translocada para o núcleo em resposta a agentes que induzem danos na molécula de DNA sugere que a RP2 humana deverá ter um papel na reparação de danos do DNA (Yoon et al., 2006). Por outro lado, existe um possível domínio *coiled coil* de proteína STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) entre os resíduos de aminoácido 28-129 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?g=ENSG00000113838;r=3:186264128-186285141;t=ENST00000338733) no TBCCD1 humano. A família de proteínas STAT é formada por factores de transcrição que actuam como transdutores de sinais no citoplasma e activadores de transcrição no núcleo. As proteínas STAT são activadas por fosforilação através de cinases da família JAK, causando a sua dimerização e translocação para o núcleo (Kisseleva et al., 2002). Assim, uma vez que a proteína TBCCD1 é relacionada em termos de sequência com a proteína RP2 e que esta aparece localizada no núcleo em resposta a certos sinais, e que por sua vez o TBCCD1 possui um putativo domínio STAT na sua sequência, é possível sugerir que o TBCCD1 poderá desempenhar uma função no compartimento nuclear em situações que ainda não foram identificadas.

No estudo de qual o impacto da presença da proteína TBCCD1 Δ CARP+TBCC para o funcionamento celular investigou-se também se a organização do citoesqueleto de actina se encontrava afectada. De facto, esta proteína TBCCD1 truncada não possui o domínio funcional

CARP, o qual está relacionado com as proteínas CAP (*cyclase-associated proteins*), proteínas que se ligam a monómeros de G-actina e estão envolvidas na polimerização do citoesqueleto de actina (Hubberstey & Mottillo, 2002). Verificou-se então que na ausência do domínio CARP do TBCCD1 não existe alterações visíveis do citoesqueleto de actina das células transfectadas com a proteína truncada, continuando estas a apresentar feixes de filamentos de actina com o arranjo normal. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos com o silenciamento da proteína TBCCD1 pela técnica de RNAi em que também não se identificaram diferenças no citoesqueleto de actina nas células silenciadas, comparativamente às células controle (Gonçalves, 2010). Porém, a função do domínio CARP pode estar associada à presença da proteína no centrossoma, sendo que neste caso a proteína não se localiza nessa estrutura. A função deste domínio poderá também estar mascarada pela presença da proteína TBCCD1 endógena no mesmo local e mesmo no citoplasma. Desta forma, não é possível ainda concluir sobre qual a função do domínio CARP na proteína TBCCD1 humana.

V.4 Estudo das mutações pontuais na proteína TBCCD1 humana

Na comparação das sequências de resíduos de aminoácidos da região C-terminal do TBCCD1 de várias espécies foi também verificada a existência de um motivo VxPx (sendo x um aminoácido qualquer) na região N-terminal do TBCCD1, imediatamente a seguir ao domínio composto pelos 20 primeiros resíduos de aminoácidos. Na proteína TBCCD1 humana este motivo corresponde a uma sequência de resíduos de aminoácidos VPPP e esta encontra-se conservada entre várias espécies, mesmo em organismos fora do reino *animalia*, como é o caso da planta *Arabidopsis thaliana*. Mesmo as plantas que não possuem este motivo conservado, apresentam vários resíduos de prolina na mesma região da sequência, o que não se verifica para as algas, como a *Chlamydomonas reinhardtii*. Este motivo foi recentemente identificado na proteína rodopsina e é responsável pela localização desta proteína no cílio primário, correspondendo a um *ciliary targeting motif* (Mazelova et al., 2009). Mutações na proteína rodopsina dentro deste motivo VxPx conduzem a que a proteína deixe de ser reconhecida na célula, não sendo assim levada para o local onde exerce a sua função (Deretic et al., 2005). Assim, a presença deste motivo na proteína TBCCD1 de vários dos organismos analisados sugere que a sua existência será importante para o desempenho de alguma função da proteína, tanto a nível da localização desta no cílio primário, como provavelmente a nível da sua estrutura tridimensional, uma vez que faz parte de um conjunto de três prolinas

conservado e que estas são resíduos de aminoácidos importantes a nível estrutural nas proteínas, sendo por isso um bom alvo de estudo.

Por estas razões, este motivo VxPx foi um dos locais escolhidos para a criação de mutações na proteína TBCCD1 para se tentar estudar a função da mesma. Assim, quando a prolina conservada do motivo na posição 24 do TBCCD1 humano foi substituída por uma alanina (TBCCD1 P24A) observou-se que há uma tendência para a γ -tubulina deixar de se localizar no centróssoma, ocorrendo uma diminuição da intensidade da marcação desta proteína neste centro organizador de microtúbulos. Nas células HEK 293T esta mutação provoca vários efeitos na localização da γ -tubulina, sendo que a perda total desta proteína a partir do centróssoma ocorre em cerca de 50% das células analisadas. Contudo, algumas células apresentavam níveis de γ -tubulina centróssomal comparáveis aos níveis normais de expressão (40%) ou apenas uma redução destes níveis no centróssoma (1,5%) (figura IV.13.). No seu conjunto estes resultados sugerem a ocorrência de uma menor quantidade de γ -tubulina no centróssoma devido à presença de TBCCD1 P24A, pelo que a função do centróssoma, nomeadamente ao nível da capacidade nucleadora de microtúbulos, poderá estar afectada. Será interessante num futuro próximo avaliar experimentalmente esta hipótese.

Curiosamente, nas células HeLa não se identificaram células em que ocorresse a perda total da marcação da γ -tubulina no centróssoma, observando-se em todas as células marcações desta proteína no centróssoma equivalentes ou mais fracas do que as observadas para as células controlo. A diversidade de fenótipos observada relativamente à presença de γ -tubulina no centróssoma poderá ser devida à competição do TBCCD1 com a proteína endógena para esta estrutura, assim como aos diferentes níveis de proteína mutada que poderão ser expressos em cada linha celular, uma vez que as células HEK 293T são capazes de sobreexpressar maiores quantidades de proteína que as células HeLa, o que pode levar à observação de fenótipos mais evidentes.

Os resultados obtidos com esta mutação constituem a primeira evidência de que o TBCCD1 poderá interagir com a γ -tubulina, mais especificamente relacionado directa ou indirectamente com a presença desta proteína no centróssoma. Este fenótipo relativo à γ -tubulina já foi observado com outras proteínas centróssomais, que se sabe terem uma ligação com esta proteína. Um exemplo é o caso da proteína NEDD1 ou GCP-WD, um componente do γ -TuRC, que tem como principal função o recrutamento deste complexo para o centróssoma e fuso mitótico. O recrutamento deste complexo é regulado pela interacção directa da proteína NEDD1 com a γ -tubulina (Manning et al., 2010). Neste caso, quando se introduzem

mutações pontuais na região C-terminal da proteína NEDD1, região responsável pela interação com a γ -tubulina, o fenótipo é igual ao que acontece com o TBCCD1, ou seja, há uma diminuição da marcação da γ -tubulina no centrossoma na maioria das células, ficando esta sequestrada no citoplasma (Manning et al., 2010). A actividade da proteína NEDD1 é dependente da fosforilação desta pelas proteínas Cdk1 e Plk1, promovendo assim a interacção da NEDD1 com a γ -tubulina, processo essencial para a localização desta no centrossoma (Manning et al., 2010). Este facto é interessante, uma vez que a proteína TBCCD1 também possui dois locais putativos de fosforilação, a serina 340 e a tirosina 343 (Mayya et al., 2009). Outro exemplo é o caso da proteína centrossomal TBCD, uma vez que, como referido anteriormente, a sobreexpressão isolada dos dois domínios presentes no TBCD, CLD1 e CLD2, responsáveis pela sua localização no centrossoma resulta na perda de γ -tubulina no centrossoma (Cunningham & Kahn, 2008), sugerindo assim semelhanças entre as duas proteínas, TBCCD1 e TBCD.

Todos estes dados sugerem que a proteína TBCCD1 interaja com a γ -tubulina directa ou indirectamente, podendo esta proteína ser um dos parceiros moleculares do TBCCD1. Além disso, a identificação de putativas proteínas que interajam com o TBCCD1 revelar-se-á também extremamente importante uma vez que dará pistas valiosas relativamente à possível função desta proteína.

Face aos resultados anteriormente discutidos relativos aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1, decidimos aprofundar este estudo analisando a estrutura tridimensional hipotética da extremidade N-terminal da proteína TBCCD1 humana, em particular os primeiros 20 resíduos de aminoácidos e o motivo VxPx, usando a ferramenta *PEPstr Server* (<http://www.imtech.res.in/raghava/pepstr/home.html>). A ferramenta *PEPstr Server* prevê bioinformaticamente a estrutura terciária de pequenos péptidos com sequências que podem variar de 7 a 25 resíduos de comprimento (Kaur et al., 2007). Neste caso foram estudados os primeiros 25 resíduos de aminoácidos do TBCCD1, que incluem as zonas importantes a estudar, em três análises diferentes: (i) os primeiros 20 resíduos de aminoácidos, ou seja, a sequência de aminoácidos crítica para a ligação da proteína ao centrossoma, (ii) os primeiros 25 resíduos de aminoácidos, ou seja, a sequência de aminoácidos crítica para a ligação da proteína ao centrossoma mais o motivo VxPx, composto por três prolínas e (iii) os primeiros 25 resíduos de aminoácidos com a mutação P24A no motivo VxPx.



Figura V.1. Previsão da estrutura terciária dos primeiros 25 resíduos de aminoácidos da região N-terminal da proteína TBCCD1. A análise da previsão da estrutura terciária foi obtida através da ferramenta *PEPstr Server* presente no site <http://www.imtech.res.in/raghava/pepstr/home.html> (Kaur et al., 2007). Neste estudo foram analisados **(A)** os primeiros 20 resíduos de aminoácidos, **(B)** os primeiros 25 resíduos de aminoácidos, incluindo o motivo VxPx, composto por três prolina e **(C)** os primeiros 25 resíduos de aminoácidos com a mutação P24A no motivo VxPx. **(D)** Sobreposição das estruturas dos primeiros 25 resíduos de aminoácidos sem (rosa) e com a mutação na prolina 24 (azul claro). A partir desta análise foi previsto que as três prolina do motivo VxPx constituem uma estrutura em hélice alfa que é perdida quando se introduz a mutação na prolina 24. Todas as estruturas foram analisadas no programa UCSF Chimera.

Com esta análise observou-se que a região crítica para a localização centrossomal do TBCCD1, ou seja, os primeiros 20 resíduos de aminoácidos, apresenta uma estrutura *Random-coil* (figura V.1.), isto é, não tem uma estrutura secundária definida. Quando se analisaram os primeiros 25 resíduos de aminoácidos que incluem o motivo VxPx verificou-se que na zona das

três prolina deste motivo há a formação de uma estrutura em hélice alfa (figura V.1. B). A formação da estrutura em hélice alfa na zona do motivo VxPx leva a que a orientação da extremidade N-terminal da proteína TBCCD1 sem a mutação seja distinta da com a mutação, podendo aparentemente desta forma impedir a interacção da proteína no centróssoma com parceiros moleculares ou a identificação destes.

No entanto, quando se analisou esta mesma sequência mas com a mutação P24A observou-se que a estrutura em hélice alfa formada pelas três prolina é perdida (figura V.1.C), devido à substituição da prolina 24 por uma alanina, afectando assim dramaticamente a estrutura tridimensional do TBCCD1 nesta região. Estes dados são também bastante interessantes, uma vez que a zona da proteína NEDD1 que interage com a γ -tubulina tem também uma estrutura em hélice alfa (Manning et al., 2010). Assim, é possível especular que o TBCCD1 poderá interagir com a γ -tubulina e ajudar no recrutamento desta para o centróssoma através do domínio composto pelas três prolina do motivo VxPx na região N-terminal da proteína, uma vez que quando a estrutura em hélice alfa formada por estes resíduos é perdida a γ -tubulina também é perdida no centróssoma.

Para além da mutação na prolina 24 da sequência da proteína TBCCD1 foram escolhidas e introduzidas mais quatro mutações na proteína individualmente, TBCCD1 K292E, K295E, P365A e R386C. As mutações K292E e K295E estão localizadas no motivo KRAK na região N-terminal. A mutação P365A foi criada no resíduo de prolina conservado entre as três proteínas TBCCD1, TBCC e RP2. A mutação R386C foi introduzida no resíduo de arginina que poderá apresentar actividade de GAP. Estas quatro mutações não produziram qualquer fenótipo diferente das células controlo relativamente à marcação do centróssoma pelo anticorpo para a γ -tubulina, à localização da proteína TBCCD1 mutada nem à posição do centróssoma relativamente ao núcleo (figuras IV.14. – IV.17.). Relativamente à mutação no resíduo de arginina do TBCCD1 na posição 386 (R386C), esta foi escolhida para testar a hipótese de o TBCCD1 possuir uma actividade de GAP e para assim perceber se este será um resíduo crítico para a função da proteína. Assim, os dados obtidos tanto na análise de bioinformática e no ensaio de complementação em levedura (Gonçalves et al., 2010a), como neste estudo, tornam pouco provável a hipótese da proteína TBCCD1 ser uma GAP para a tubulina ou outras proteínas. Assim, caso o TBCCD1 partilhasse esta função com o TBCC e com a RP2, o TBCD seria um seu parceiro provável, uma vez que, como referido na introdução, tanto o TBCC como a RP2 actuam em conjunto com o TBCD para activar a actividade de GTPase da β -tubulina (Bartolini et al., 2002) e esta também é uma proteína centróssomal (Cunningham & Kahn, 2008).

V.5 Estudo do papel da proteína TBCCD1 humana na ciliogénese

É sabido que o TBCCD1 se localiza no corpo basal dos cílios primários e motores, sendo esta localização provavelmente devida ao facto desta proteína possuir dois domínios candidatos a estarem envolvidos nesta localização, os motivos VxPx e KRAK. Como as três mutações P24A, K292E e K295E produzidas na proteína TBCCD1 e analisadas anteriormente se localizam nestes motivos, estas três proteínas mutadas foram novamente alvo de estudo, mas no que diz respeito ao seu impacto na ciliogénese. Além disso, o TBCCD1 é uma proteína importante para a ciliogénese, uma vez que o silenciamento do gene *tbccd1* leva a uma diminuição da eficiência das células epiteliais humanas RPE-1 para montar cílios primários (Gonçalves et al., 2010a).

Quando se avaliou a função das células relativamente à capacidade de montarem cílios observou-se que a população de células a expressarem a proteína TBCCD1 com as mutações P24A, K292E e K295E apresenta uma diminuição na capacidade de montar cílios primários, relativamente à população controlo (figura IV.18.). No entanto, não se identificaram diferenças significativas na quantidade de cílios entre as células que expressavam cada uma das três proteínas mutadas. Mais ainda, nos cílios primários formados pelas células que expressam a proteína TBCCD1 com as mutações, estas localizam-se no corpo basal correspondente, o que indica a proteína mutada é capaz de se localizar nestas estruturas. Assim, não é possível estabelecer se a proteína TBCCD1 estará directamente envolvida no processo da ciliogénese ou se a menor eficiência na produção de cílios das células transfectadas com as proteínas mutadas será um efeito indirecto.

No caso das mutações no motivo KRAK (TBCCD1 K292E e K295E) não se observou o mesmo fenótipo que se observou no estudo em que se mutou o motivo KRKK na proteína KIF17 (Dishinger et al., 2010). Enquanto que na proteína TBCCD1 as mutações apenas levaram à diminuição da eficiência da formação de cílios primários, as mutações no *ciliary localization signal* da proteína KIF17 levou à total abolição da localização da proteína no cílio. No entanto, as diferenças de fenótipo podem ser devidas ao facto de no estudo da proteína KIF17 todos os resíduos de aminoácidos do motivo KRKK foram substituído por resíduos de alanina na mesma experiência, enquanto que no caso do TBCCD1 as mutações foram introduzidas individualmente, o que pode justificar o facto de o fenótipo ser mais atenuado.

Por outro lado, a proteína TBCCD1 foi também recentemente localizada na zona de transição do cílio primário em células RPE-1 (figura V.2.). Assim, as três formas de TBCCD1 mutado podem também apresentar dificuldades na localização na zona de transição, levando a uma

menor eficiência na montagem de cílios primário. No entanto, a análise realizada não permite verificar se estas proteínas se localizam nesta zona, uma vez que o estudo foi efectuado num microscópio DMRA2 que não tem a mesma resolução do sistema DeltaVision, onde a zona de transição foi visualizada. Além disso, a figura V.2. foi sujeita a tratamento de imagem, uma vez que houve a desconvolução da imagem, para melhorar o contraste e a resolução da mesma.

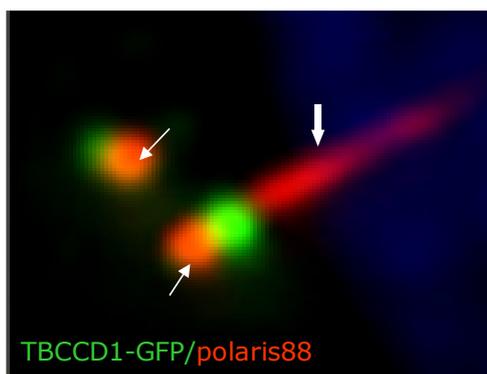


Figura V.2. Localização da proteína TBCCD1 no cílio de células RPE-1. As setas mais finas indicam que a proteína TBCCD1 localiza-se no corpo basal (laranja) e na zona de transição (verde) no cílio das células RPE-1. A seta mais larga indica o axonema (vermelho) das células RPE-1 (resultados obtidos por João Gonçalves). Imagem adquirida no DeltaVision.

O facto de se verificar a presença das três formas de TBCCD1 mutado nos corpos basais dos cílios primários e a diminuição do número de cílios primários nas células transfectadas em relação às células controlo, sugere que o efeito observado na ciliogénese seja indirecto. De facto, os resultados obtidos tanto para o silenciamento do TBCCD1 por RNAi como para o TBCCD1 de *C. reinhardtii* apoiam esta hipótese. No caso das células em que o *tbccd1* foi silenciado verificou-se também uma menor capacidade de montar cílio pelas células onde ocorreu o silenciamento do gene *tbccd1*, sendo a proteína TBCCD1 que permanecia na célula suficiente para este realizar este processo (Gonçalves et al., 2010a). Assim, no presente estudo é possível que a existência da proteína TBCCD1 endógena esteja relacionada com a existência de cílios, embora em menor quantidade, nas células transfectadas. Por outro lado, um dos fenótipos apresentados pelas células mutantes *asq2* de *C. reinhardtii* é a presença de um número aberrante de centríolos. Porém, estas células apresentam números anormais de flagelos, entre zero a sete por célula, o que mostra que mesmo os centríolos em grande

número têm capacidade de se tornarem corpos basais dos flagelos, não sendo o TBCCD1 essencial para a sua formação (Feldman & Marshall, 2009).

É ainda importante referir que em todos os resultados obtidos é possível que não se observe um fenótipo mais evidente por diversas razões. Uma delas é o facto de o TBCCD1 endógeno estar sempre presente em todas as análises e de este ser possivelmente muito estável, podendo assim mascarar possíveis alterações na célula. Assim, a diversidade de fenótipos poderá estar relacionada com este factor, uma vez que as proteínas TBCCD1 mutantes utilizadas, quer com deleções quer com mutações pontuais, estavam a competir com a proteína endógena, sendo este um factor muito importante na análise dos fenótipos observados. Num estudo recente quando se provocou o silenciamento do TBCCD1 por RNAi, este foi também um processo difícil, em que não se conseguiu eliminar por completo os níveis da proteína endógena sugerindo ser esta muito estável. Assim, os níveis remanescentes de TBCCD1 poderão desempenhar parte das funções da proteína (Gonçalves et al., 2010a). Outro factor importante a considerar é o facto de os fenótipos resultantes do silenciamento da proteína TBCCD1 por RNAi terem sido apenas observados em células RPE-1 (Gonçalves et al., 2010a). A linha celular hTERT-RPE-1 provém do epitélio pigmentado da retina imortalizada pela expressão estável da proteína telomerase humana, responsável pela manutenção do tamanho dos telómeros. Esta linha foi escolhida no estudo referido por apresentar um fenótipo considerado normal, ao contrário das HeLa e HEK 293T, que são linhas derivadas de tumores. Estas células ofereciam ainda a vantagem de permitirem o estudo dos vários aspectos da função do centróssoma incluindo a sua capacidade de se tornar corpo basal do cílio primário. De facto, a linha celular RPE-1 é usualmente utilizada em estudos de centróssomas e cílios primários. No entanto, no presente estudo não conseguimos transfectar eficientemente este tipo de células, podendo certas alterações serem devidas às características das células HEK 293T e HeLa por serem linhas cancerígenas. Relativamente às diferenças encontradas entre as linhas celulares utilizadas neste estudo (HEK 293T e HeLa), as células HEK 293T apresentam níveis de sobreexpressão das proteínas TBCCD1 mutadas muito superiores que as células HeLa, havendo assim mais proteína mutada nas células HEK 293T a competir com a proteína endógena do que nas células HeLa, o que poderá influenciar o aparecimento de fenótipo, assim com o grau de intensidade deste.

É também importante realçar que com a sobreexpressão de todas as formas da proteína TBCCD1 se verificou uma agregação frequente da proteína no citoplasma, havendo uma tendência de localização na região em torno do centróssoma. Estas observações poderão estar correlacionadas com as diferenças encontradas entre as duas linhas celulares utilizadas, uma

vez que a agregação é mais evidente nas células HeLa do que nas células HEK 293T. De facto, poderá especular-se que o *turn-over* da proteína TBCCD1 no centrossoma das células HeLa poderá ser mais lento do que nas células HEK 293T, o que levaria a uma maior dificuldade na incorporação da proteína TBCCD1 mutada no centrossoma por competição com a endógena. Assim, a proteína tenderia a acumular-se perto do centrossoma o que justificaria o aparecimento dos agregados nesta zona. No caso da agregação observada com o TBCCD1 20aa os resultados estão de acordo com os dados obtidos no perfil de hidropatia anteriormente referido, uma vez que estes indicavam que a proteína apresenta uma zona hidrófoba no início da sua região N-terminal. Verificou-se também que quanto maior a eficiência de transfecção das células, e conseqüente maior nível de sobreexpressão da proteína, o nível de agregação desta é também frequentemente maior.

Um dos fenótipos mais importantes encontrados até à data da proteína TBCCD1 foi, a quando do silenciamento desta, o afastamento do centrossoma do núcleo. Nas células silenciadas o centrossoma encontrava-se deslocado do centro da célula deixando de estar associado ao núcleo e apresentando-se frequentemente na periferia da célula. No conjunto, estes resultados mostraram que a proteína TBCCD1 é requerida para o correcto posicionamento do centrossoma no centro da célula em associação com o núcleo. Além disso, também foi avaliada a capacidade de nucleação e ancoramento dos microtúbulos do centrossoma em células silenciadas, não se tendo encontrado qualquer problema nesta função (Gonçalves et al., 2010a). No presente estudo não se identificou qualquer problema relativamente à localização do centrossoma na célula em relação ao núcleo, indicando que as formas de TBCCD1 construídas não parecem afectar o posicionamento deste organelo. No entanto, não foram efectuadas experiências para testar a capacidade nucleadora de microtúbulos do centrossoma, sendo uma das perspectivas de trabalho futuro.

Em conclusão, este estudo veio demonstrar que a proteína TBCCD1 humana desempenha um papel importante na célula, principalmente a nível do centrossoma e na formação de cílios primários. Um dos principais contributos deste estudo é a descoberta de que o TBCCD1 tem um papel importante, directo ou indirecto, na ligação à γ -tubulina. Este estudo permitiu também estabelecer uma relação entre a estrutura da proteína, a sua localização e a sua função, no que diz respeito à região N-terminal da proteína, principalmente aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos e ao motivo VxPx. Assim, tendo em conta os resultados por nós obtidos, suportados pelos dados do estudo da proteína TBCCD1 por Gonçalves e colaboradores e do estudo da proteína TBCCD1 de *C. reinhardtii* (Feldman & Marshall, 2009), é possível

colocar a hipótese de que esta proteína desempenhe funções essenciais *in vivo* na biologia do centrossoma/corpo basal e dos cílios.

VI – Conclusões e Perspectivas

A proteína TBCCD1 é uma proteína centrossomal que é relacionada em termos de sequência com o cofactor da tubulina TBCC e a com a proteína RP2, uma vez que possui os domínios funcionais TBCC e CARP e que foi recentemente descrita em *Chlamydomonas reinhardtii* e linhas celulares humanas (Feldman & Marshall, 2009; Gonçalves et al., 2010a). Em células humanas o TBCCD1 foi identificado no centrossoma, na zona mediana do fuso mitótico, no corpo médio e no corpo basal de cílios primários e motores (Gonçalves, 2010). A sua recente caracterização demonstrou que o TBCCD1 é um potencial regulador do posicionamento do centrossoma e do seu ancoramento ao núcleo, assim como da organização citoplasmática, no entanto a função principal da proteína ainda não é conhecida.

O presente trabalho teve como principal objectivo o estudo da função biológica da proteína TBCCD1, nomeadamente o seu possível envolvimento em processos dependentes dos microtúbulos e ancoramento do centrossoma ao núcleo. Para tal, o estudo incidiu na determinação e caracterização dos domínios da proteína envolvidos nas suas funções através da utilização de formas truncadas e mutadas da proteína TBCCD1 humana expressas nas linhas celulares humanas, HEK 293T e HeLa.

A localização centrossomal do TBCCD1 é determinada por um domínio presente na sua região N-terminal (Gonçalves et al., 2010a). Assim, com a realização do presente trabalho foi possível determinar quais os limites deste domínio, através da criação e caracterização de proteínas com deleções na sua extremidade N-terminal, correspondendo este aos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da região N-terminal.

A proteína TBCCD1 é conservada ao longo da evolução estando presente na maioria dos organismos eucariotas (Gonçalves et al., 2010a). Uma comparação mais detalhada do domínio composto pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos da proteína TBCCD1 de várias espécies levou à conclusão que este é conservado mas apenas entre espécies do reino *animalia*, maioritariamente nos vertebrados. Assim, este domínio poderá estar relacionado com a especialização da função da proteína TBCCD1 no centrossoma de células animais, especialmente nos vertebrados.

Por outro lado, a presença do TBCCD1 em plantas, organismos sem centrossomas, sugere que a proteína possui um papel importante na célula fora da estrutura do centrossoma, uma vez

que quando se sobreexpressou a proteína TBCCD1 de *Arabidopsis thaliana* em fusão com a GFP, esta não se localiza no centróssoma das células. Estes resultados sugerem que a presença da proteína TBCCD1 em vários organismos não está directamente relacionada com presença de centróssomas/corpos basais.

O estudo da região C-terminal da proteína TBCCD1 pela deleção de parte desta região que inclui os dois domínios funcionais CARP e TBCC (TBCCD1 Δ CARP+TBCC) permitiu concluir que a proteína não se localizou no centróssoma. Este resultado sugere que a localização centróssomal da proteína depende simultaneamente da presença dos primeiros 20 resíduos de aminoácidos e da presença dos domínios CARP e TBCC na região C-terminal. Curiosamente neste caso também se identificou a acumulação da proteína no núcleo, que não corresponde a uma localização natural da proteína TBCCD1 selvagem.

A presença de um domínio CARP no TBCCD1 sugere um possível papel desta proteína na regulação do citoesqueleto de actina, podendo estar envolvida no *cross-talk* entre os citoesqueletos de actina e microtúbulos. No entanto, até ao momento não existem evidências de qualquer relação das proteínas TBCC, RP2 e TBCCD1, que também possuem um domínio CARP, com a actina. Finalmente, com a deleção de parte da C-terminal incluindo este domínio, não se observaram alterações no citoesqueleto de actina de células HeLa.

O estudo da função da proteína TBCCD1 em linhas celulares humanas através da expressão da proteína com mutações pontuais em fusão com a proteína GFP mostrou que a prolina conservada do motivo VxPx na posição 24 do TBCCD1 humano é importante para a localização da γ -tubulina no centróssoma, uma vez que quando foi substituída por uma alanina (TBCCD1 P24A) observou-se uma menor quantidade desta proteína no centróssoma. Estes resultados constituem a primeira evidência de que o TBCCD1 poderá interagir com a γ -tubulina, directa ou indirectamente, podendo esta proteína ser um parceiro molecular do TBCCD1.

Tanto o TBCC como a RP2 estão descritos como sendo proteínas com actividade GAP que lhes é conferida pelo seu domínio TBCC, no entanto os resíduos de aminoácidos cruciais para a actividade GAP não são conservados no TBCCD1, sugerindo que esta proteína não possua esta actividade. Os resultados observados para a mutação introduzida no resíduo de arginina que poderá apresentar actividade de GAP vêm de encontro a estes dados, uma vez que não se verificou qualquer alteração nas células aquando da expressão desta proteína mutante. Assim, os dados obtidos tanto na análise de bioinformática e no ensaio de complementação em levedura (Gonçalves et al., 2010a), como neste estudo, tornam pouco provável a hipótese da proteína TBCCD1 ser uma GAP para a tubulina ou outras proteínas.

Através do estudo do impacto das mutações P24A, K292E e K295E no TBCCD1 a nível da biogénese de cílios primário observou-se que ocorre uma diminuição na capacidade de montar cílios primários. Estes resultados são suportados pelos resultados obtidos para o silenciamento da proteína TBCCD1 humana, em que também se verificou uma menor eficiência na formação de cílios primários (Gonçalves et al., 2010a), sugerindo que estes motivos serão importantes neste processo.

Assim, o estudo da proteína TBCCD1 humana ainda se encontra no início e seria de extrema importância a realização de várias experiências no futuro que visam continuar a caracterização desta proteína, como por exemplo:

- 1) Identificação dos resíduos de aminoácidos determinantes na localização do TBCCD1 no centróssoma dentro da região composta pelos primeiros 20 resíduos de aminoácidos através de uma análise mais detalhada desta região da proteína.
- 2) Continuação do estudo da função da proteína TBCCD1 em organismos sem centróssomas, como as plantas, para providenciar pistas acerca da função da proteína fora do centróssoma.
- 3) Clarificação dos fenótipos gerados pela expressão da proteína truncada TBCCD1 Δ CARP+TBCC.
- 4) Estudo da função do centróssoma relativa à sua capacidade nucleadora de microtúbulos com a proteína mutada TBCCD1 P24A, que gera o fenótipo da deslocalização da γ -tubulina nesta estrutura.
- 5) Determinação da organização do complexo de Golgi com a proteína TBCCD1 com as 5 diferentes mutações pontuais.
- 6) Identificação de putativas proteínas que interajam com o TBCCD1 para dar pistas relativamente à possível função desta proteína.
- 7) Determinação da estrutura tridimensional da proteína TBCCD1 humana.

Em conclusão, o presente trabalho constitui uma nova abordagem do estudo da proteína TBCCD1 e no seu conjunto os resultados obtidos identificaram o TBCCD1 como uma possível nova proteína envolvida na interacção com a γ -tubulina. Os resultados por nós obtidos até ao momento não nos permitem indicar qual a função exacta da proteína TBCCD1, se terá um

papel regulador ou estrutural, e se esta proteína actua directa ou indirectamente nos processos que se encontram afectados aquando da introdução de mutações pontuais. Assim, ao se prosseguir com o estudo da proteína TBCCD1 esperamos contribuir para a compreensão dos processos implicados na montagem dos cílios primários e na ligação à γ -tubulina, assim como noutros processos celulares em que a proteína esteja implicada.

VII – Referências

- Aldaz, H., Rice, L.M., Stearns, Tim, & Agard, D.A. (2005). Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin. *Nature*, 435(7041), 523-7.
- Amos, L.A, Schlieper, D. (2005). Microtubules and maps. *Advances in protein chemistry*, 71(04), 257-98.
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg E.A., Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 426:570-4.
- Archer, J.E., Vega, L.R., Solomon, F. (1995). Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function *in vivo*. *Cell*, 82:425-34.
- Bader, I., Brandau, O., Achatz, H., Apfelstedt-Sylla, E., Hergersberg, M., Lorenz, B., Wissinger, B., Wittwer, B., Rudolph, G., Meindl, A., Meitinger, T. (2003). X-linked Retinitis Pigmentosa: RPGR Mutations in Most Families with Definite X Linkage and Clustering of Mutations in a Short Sequence Stretch of Exon ORF15. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(4), 1458-1463.
- Bartolini, F., Bhamidipati, A., Thomas, S., Schwahn, U., Lewis, S.A., Cowan, N.J. (2002). Functional overlap between retinitis pigmentosa 2 protein and the tubulin-specific chaperone cofactor C. *The Journal of biological chemistry*, 277(17), 14629-34.
- Bartolini, F., Tian, G., Piehl, M., Cassimeris, L., Lewis, S.A, Cowan, N.J. (2005). Identification of a novel tubulin-destabilizing protein related to the chaperone cofactor E. *Journal of cell science*, 118:1197-207.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, 340(4), 783-95.
- Bertling, E., Hotulainen, P., Mattila, P.K., Matilainen, T., Salminen, M., Lappalainen, P. (2004). Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Promotes Cofilin-induced Actin Dynamics in Mammalian Nonmuscle Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2324 -2334.
- Bettencourt-Dias, M, Rodrigues-Martins, A, Carpenter, L, Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, M.K., Carmo, N., Balloux, F., Callaini, G., Glover, D.M. (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Current biology*, 15(24), 2199-207.
- Bettencourt-Dias, M., Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 451-63.
- Bhamidipati, A., Lewis, S.A, Cowan, N.J. (2000). ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *The Journal of cell biology*, 149(5), 1087-96.

Bornens, M. (2008). Organelle positioning and cell polarity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(11), 874-86.

Bouissou, A., Vérollet, C., Sousa, A., Sampaio, P., Wright, M., Sunkel, C.E., Merdes, A., Raynaud-Messina, B. (2009). γ -Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *The Journal of cell biology*, 187(3), 327-34.

Breuer, D.K., Yashar, B.M., Filippova, E., Hiriyanna, S., Lyons, R.H., Mears, A.J., Asaye, B., Acar, C., Vervoort, R., Wright, A.F., Musarella, M.A., Wheeler, P., MacDonald, I., Iannaccone, A., Birch, D., Hoffman, D.R., Fishman, G.A., Heckenlively, J.R., Jacobson, S.G., Sieving, P.A., Swaroop, A. (2002). A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPGR in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa. *American journal of human genetics*, 70(6), 1545-54.

Burakov, A., Nadezhdina, E., Slepchenko, B., Rodionov, V. (2003). Centrosome positioning in interphase cells. *The Journal of cell biology*, 162(6), 963-9.

Campo, R., Fontalba, A., Sanchez, L.M., Zabala, J.C. (1994). A 14 kDa release factor is involved in GTP-dependent beta-tubulin folding. *FEBS letters*, 353(2), 162-6.

Carvalho, S. (2010) Estudo da proteína humana centrossomal TBCCD1 em condições de stress oxidativo causadas por H₂O₂ em estado estacionário. Tese de mestrado, FC, UL.

Carvalho-Santos, Z., Machado, P., Branco, P., Tavares-Cadete, F., Rodrigues-Martins, A., Pereira-Leal, J.B., Bettencourt-Dias, M. (2010). Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *Journal of cell science*, 123(Pt 9), 1414-26.

Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F., Settegrana, C., Drechou, A, Durand, G., Poüs, C. (2001). The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Molecular biology of the cell*, 12(7), 2047-60.

Chae, S., Yun, C., Um, H., Lee, J.H., Cho, H. (2005). Centrosome amplification and multinuclear phenotypes are induced by hydrogen peroxide. *Experimental & molecular medicine*, 37(5), 482-7.

Chapple, J.P., Hardcastle, A.J., Grayson, C., Spackman, L.A, Willison, K.R., Cheetham, M.E. (2000). Mutations in the N-terminus of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2 interfere with the normal targeting of the protein to the plasma membrane. *Human molecular genetics*, 9(13), 1919-26.

Cheeseman, I.M., Desai, A. (2005) A combined approach for the localization and tandem affinity purification of protein complexes from metazoans. *Sci STKE*, 2005:p11.

Chen, C.H., Howng, S.L., Cheng, T.S., Chou, M.H., Huang, C.Y., Hong, Y.R. (2003). Molecular characterization of human ninein protein: two distinct subdomains required for centrosomal targeting and regulating signals in cell cycle☆. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(4), 975-983.

Chevrier, V., Piel, M., Collomb, N., Saoudi, Y., Frank, R., Paintrand, M., Narumiya, S., Bornens, M., Job, D. (2002). The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *The Journal of cell biology*, 157(5), 807-17.

Conde, C., Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 319-332.

Cunningham, L.A, Kahn, R.A. (2008). Cofactor D functions as a centrosomal protein and is required for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex at centrosomes and organization of the mitotic spindle. *The Journal of biological chemistry*, 283(11), 7155-65.

Debec, A., Sullivan, W., Bettencourt-Dias, M. (2010). Centrioles: active players or passengers during mitosis? *Cellular and molecular life sciences* :67(13), 2173-94.

Deretic, D., Williams, A.H., Ransom, N., Morel, V., Hargrave, P.A, Arendt, A. (2005). Rhodopsin C terminus, the site of mutations causing retinal disease, regulates trafficking by binding to ADP-ribosylation factor 4 (ARF4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3301-6.

Desai, A, Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, 13, 83-117.

Dishinger, J.F., Kee, H.L., Jenkins, P.M., Fan, S., Hurd, T.W., Hammond, J.W., Truong, Y. N.-T., Margolis, B., Martens, J.R., Verhey, K.J. (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nature cell biology*, 12(7), 703-10.

Doxsey, S. (2001) Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 688-98.

Du, Y., Cui, M., Quian, D., Zhu, L., Wei, C., Yuan, M., Zhang, Z., Li, Y. (2010) AtTFC B is involved in control of cell division. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2:752-63.

Evans, R.J., Schwarz, N., Nagel-Wolfrum, K., Wolfrum, U., Hardcastle, A.J., Cheetham, M.E. (2010). The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Human molecular genetics*, 19(7), 1358-67.

Fanarraga, M.L., Bellido, J., Jaén, C., Villegas, J.C., Zabala, J.C. (2010a). TBCD links centriologenesi, spindle microtubule dynamics, and midbody abscission in human cells. *PLoS one*, 5(1), e8846.

Fanarraga, M.L., Carranza, G., Castaño, R., Jiménez, V., Villegas, J.C., Zabala, J.C. (2010b). Emerging roles for tubulin folding cofactors at the centrosome. *Communicative & integrative biology*, 3(4), 306-8.

Feldman, J.L., Marshall, W.F. (2009). ASQ2 encodes a TBCC-like protein required for mother-daughter centriole linkage and mitotic spindle orientation. *Current biology*, 19(14), 1238-43.

Fletcher, D.A, Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), 485-92.

Fuller, S.D., Gowen, B.E., Reinsch, S., Sawyer, A., Buendia, B., Wepf, R., Karsenti, E. (1995). The core of the mammalian centriole contains γ -tubulin. *Current Biology*, 5(12), 1384-1393.

Galjart, N. (2005) CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat Ver Mol Cell Biol*, 6:487-98.

García-Hoyos, M., Garcia-Sandoval, B., Cantalapiedra, D., Riveiro, R., Lorda-Sánchez, I., Trujillo-Tiebas, M.J., Rodriguez de Alba, M., Millan, J.M., Baiger, M., Ramos, C., Ayuson, C. (2006). Mutational screening of the RP2 and RPGR genes in Spanish families with X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(9), 3777-82.

Gergely, F., Karlsson, C., Still, I., Cowell, J., Kilmartin, J., Raff, JW. (2000). The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14352-7.

Gillingham, A.K., Munro, S. (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO reports*, 1(6), 524-9.

Gonçalves, J., Nolasco, S., Nascimento, R., Lopez-Fanarraga, M., Zabala, J.C., Soares, H. (2010a). TBCCD1, a new centrosomal protein, is required for centrosome and Golgi apparatus positioning. *EMBO reports*, 11(3), 194-200.

Gonçalves, J., Tavares, A., Carvalhal, S., Soares, H. (2010b). Revisiting the tubulin folding pathway: new roles in centrosomes and cilia. *BioMolecular Concepts*, 1(5-6), 423-434.

Gonçalves, J. (2010) Caracterização da proteína centrosomal TBCCD1, em linhas celulares humanas e durante o desenvolvimento de *Danio rerio*. Tese de doutoramento, FC, UL.

Grayson, C., Bartolini, F., Chapple, J.P., Willison, K.R., Bhamidipati, A., Lewis, S.A, Luthert, P.J., Hardcastle, A.J., Cowan, N.J., Cheetham, M.E. (2002). Localization in the human retina of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2, its homologue cofactor C and the RP2 interacting protein Arl3. *Human molecular genetics*, 11(24), 3065-74.

Grynberg, M., Jaroszewski, L., Godzik, A. (2003). Domain analysis of the tubulin cofactor system: a model for tubulin folding and dimerization. *BMC bioinformatics*, 4, 46.

Hage-Sleiman, R., Herveau, S., Matera, E.L., Laurier, J.F., Dumontet, C. (2010). Tubulin binding cofactor C (TBCC) suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells. *BMC cancer*, 10, 135.

Heald, R., Nogales, E. (2002). Microtubule dynamics. *Journal of Cell Science*, 115, 3-4.

Hoyt, M.A, Macke, J.P., Roberts, B.T., Geiser, J.R. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability. *Genetics*, 146(3), 849-57.

Hoyt, M.A, Stearns, T, Botstein, D. (1990). Chromosome instability mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that are defective in microtubule-mediated processes. *Molecular and cellular biology*, 10(1), 223-34.

Hubberstey, A., Mottillo, E.P. (2002). Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(6), 487-99.

Ishikawa, H., Marshall, W.F. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(4), 222-234.

- Jin, Z.B., Liu, X.Q., Hayakawa, M., Murakami, A., Nao-i, N. (2006). Mutational analysis of RPGR and RP2 genes in Japanese patients with retinitis pigmentosa: identification of four mutations. *Molecular vision*, 12(August), 1167-74.
- Kaur, H., Garg, A., Raghava, G.P.S. (2007). PEPstr: A de novo method for tertiary structure prediction of small bioactive peptides. *Protein and peptides letters*, 14(6), 626-631
- Kirik, V., Grini, P.E., Mathur, J., Klinkhammer, I., Adler, K., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J.M., Hulskamp, M. (2002a). The *Arabidopsis* TUBULIN-FOLDING COFACTOR A Gene Is Involved in the Control of the alpha/beta-Tubulin Monomer Balance. *Plant Cell*, 14, 2265-2276.
- Kirik, V., Mathur, J., Grini, P.E., Klinkhammer, I., Adler, K., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J.M., Hulskamp, M. (2002b). Functional analysis of the tubulin-folding cofactor C in *Arabidopsis thaliana*. *Current biology*, 12(17), 1519-23.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285, 1-24.
- Knorz, V.J., Spalluto, C., Lessard, M., Purvis, T.L., Adigun, F.F., Collin, G.B., Hanley, N.A., Wilson, D.I., Hearn, T. (2010). Centriolar association of ALMS1 and likely centrosomal functions of the ALMS motif-containing proteins C10orf90 and KIAA1731. *Molecular Biology of the Cell*, 21(21), 3617.
- Kobayashi, T., Dynlacht, B.D. (2011). Regulating the transition from centriole to basal body. *The Journal of cell biology*, 193(3), 435-44.
- Kortazar, D., Fanarraga, ML, Carranza, G, Bellido, J, Villegas, JC, Avila, J., Zabala, JC. (2007). Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation. *Experimental cell research*, 313(3), 425-36.
- Lange, B.M.H. (2002). Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(1), 35-43.
- Llosa, M., Aloria, K., Campo, R., Padilla, R., Avila, J., Sánchez-Pulido, L., Zabala, JC. (1996). The beta-tubulin monomer release factor (p14) has homology with a region of the DnaJ protein. *FEBS letters*, 397(2-3), 283-9.
- Lopez-Fanarraga, M., Avila, J., Guasch, A, Coll, M., Zabala, J.C. (2001). Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *Journal of structural biology*, 135(2), 219-29.
- Lopez-Fanarraga, M., Carranza, G, Bellido, J, Kortazar, D., Villegas, JC, Zabala, JC. (2007). Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone. *Journal of neurochemistry*, 100(6), 1680-7.
- Lüders, J., Stearns, Tim. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(2), 161-7.
- Manning, J. A, Shalini, S., Risk, J.M., Day, C.L., Kumar, S. (2010). A direct interaction with NEDD1 regulates gamma-tubulin recruitment to the centrosome. *PloS one*, 5(3), e9618.

Martín, L., Fanarraga, ML, Aloria, K., Zabala, JC. (2000). Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein. *FEBS letters*, 470(1), 93-5.

Mayya, V., Lundgren, D.H., Hwang, S.-il, Rezaul, K., Wu, L., Eng, J.K., Rodionov, V., Han, D. (2009). Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Science signaling*, 2(84).

Mazelova, J., Astuto-Gribble, L., Inoue, H., Tam, B.M., Schonteich, E., Prekeris, R., Moritz, O.L., Randazzo, P.A., Deretic, D. (2009). Ciliary targeting motif VxPx directs assembly of a trafficking module through Arf4. *The EMBO journal*, 28(3), 183-92.

Neidhardt, J., Glaus, E., Lorenz, B., Netzer, C., Li, Y., Schambeck, M., Wittmer, M., Feil, S., Kirschner-Schwabe, R., Rosenberg, T., Cremers, F.P.M., Bergen, A.A.B., Barthelmes, D., Baraki, H., Schmid, F., Tanner, G., Fleischhauer, J., Orth, U., Becker, C., Wegscheider, E., Nurnberg, G., Nurnberg, P., Bolz, H.J., Gal, A., Berger, W. (2008). Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing. *Molecular vision*, 14, 1081-93.

Nigg, E.A, Raff, J.W. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 139(4), 663-78.

Nishimura, T., Takahashi, M., Kim, H.S., Mukai, H., Ono, Y. (2005). Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 10(1), 75-86.

Nogales, E. (2001). Structural Insights Into Microtubule Function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 58(1), 1111-420.

Nolasco, S., Bellido, J., Gonçalves, J., Zabala, J.C., Soares, H. (2005). Tubulin cofactor A gene silencing in mammalian cells induces changes in microtubule cytoskeleton, cell cycle arrest and cell death. *FEBS letters*, 579(17), 3515-24.

Oakley, C.E., Oakley, B.R. (1989) Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 338:662-4.

Parvari, R., Diaz, G.A, Hershkovitz, E. (2007). Parathyroid development and the role of tubulin chaperone E. *Hormone research*, 67(1), 12-21.

Pereira, G., Schiebel, E. (1997). Centrosome-microtubule nucleation. *Journal of cell science*, 110 :295-300.

Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., Job, D. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *The Journal of cell biology*, 174(6), 839-49.

Plotnikova, O.V., Pugacheva, E.N., Golemis, E.A. (2009). Primary Cilia and the Cell Cycle. *Methods in cell biology*, (08), 137–160.

Prokisch, H., Hartig, M., Hellinger, R., Meitinger, T., Rosenberg, T. (2007). A population-based epidemiological and genetic study of X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(9), 4012-8.

Rayala, S.K., Martin, E., Sharina, I.G., Molli, P.R., Wang, X., Jacobson, R., Murad, F., Kumar, R. (2007). Dynamic interplay between nitration and phosphorylation of tubulin cofactor B in the control of microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19470-5.

Razafsky, D., Hodzic, D. (2009). Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleocytoskeletal connections. *The Journal of cell biology*, 186(4), 461-72.

Schwahn, U, Lenzner, S., Dong, J., Feil, S, Hinzmann, B., van Duijnhoven, G., Kirschner, R., Hemberger, M., Bergen, A.A., Rosenberg, T., Pinckers, A.J., Fundele, R., Rosenthal, A., Cremers, F.P., Ropers, H.H., Berger, W. (1998). Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nature genetics*, 19:327-32.

Schwahn, U., Paland, N., Techritz, S., Lenzner, S., Berger, W. (2001). Mutations in the X-linked RP2 gene cause intracellular misrouting and loss of the protein. *Human molecular genetics*, 10(11), 1177-83.

Sharon, D., Bruns, G.A.P., McGee, T.L., Sandberg, M.A, Berson, E.L., Dryja, T.P. (2000). X-linked retinitis pigmentosa: mutation spectrum of the RPGR and RP2 genes and correlation with visual function. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(9), 2712.

Sharon, D., Sandberg, M.A, Rabe, V.W., Stillberger, M., Dryja, T.P., Berson, E.L. (2003). RP2 and RPGR mutations and clinical correlations in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *American journal of human genetics*, 73(5), 1131-46.

Shern, J.F., Sharer, J.D., Pallas, D.C., Bartolini, F., Cowan, N.J., Reed, M.S., Pohl, J., Kahn, R.A. (2003). Cytosolic Arl2 is complexed with cofactor D and protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry*, 278(42), 40829-36.

Shultz, T., Shmuel, M., Hyman, T., Altschuler, Y. (2008). Beta-tubulin cofactor D and ARL2 take part in apical junctional complex disassembly and abrogate epithelial structure. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(1), 168-82.

Sluder, M., Khodjakov, A. (2010). Centriole duplication: analogue control in a digital age. *Cell Biol Int.*, 34(12), 1239-1245.

Steinborn, K., Maulbetsch, C., Priester, B., Trautmann, S., Pacher, T., Geiges, B., Küttner, F., Lepiniec, L., Stierhof, Y.D., Schwarz, H., Jurgens, G., Mayer, U. (2002). The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes & development*, 16(8), 959-71.

Stephan, A., Vaughan, S., Shaw, M.K., Gull, K., McKean, P.G. (2007). An essential quality control mechanism at the eukaryotic basal body prior to intraflagellar transport. *Traffic*, 8(10), 1323-30.

Szolajska, E., Chroboczek, J. (2011). Faithful chaperones. *Cellular and molecular life sciences*

- Sütterlin, C., Colanzi, A. (2010). The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *The Journal of cell biology*, 188(5), 621-8.
- Tian, G., Bhamidipati, A., Cowan, N.J., Lewis, S.A. (1999). Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer. *The Journal of biological chemistry*, 274(34), 24054-8.
- Tian, G., Huang, M.C., Parvari, R., Diaz, G.A., Cowan, N.J. (2006). Cryptic out-of-frame translational initiation of TBCE rescues tubulin formation in compound heterozygous HRD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(36), 13491-6.
- Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., Ampe, C., Cowan, N.J. (1996). Pathway leading to correctly folded [beta]-tubulin. *Cell*, 86(2), 287-296.
- Tian, G., Lewis, S.A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C., Cowan, N.J. (1997). Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *The Journal of cell biology*, 138(4), 821-32.
- Tian, G., Vainberg, I.E., Tap, W.D., Lewis, S.A., Cowan, N.J. (1995). Quasi-native Chaperonin-bound Intermediates in Facilitated Protein Folding. *Biochemistry*, 270(41), 23910-23913.
- Urbani, L., Stearns, T. (1999). The centrosome. *Current biology*, 9(9), R315-7.
- Vadlamudi, R.K., Barnes, C.J., Rayala, S., Li, F., Balasenthil, S., Marcus, S., Goodson, H.V., Sahin, A.A., Kumar, R. (2005). p21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), 3726-3736.
- Veltel, S., Gasper, R., Eisenacher, E., Wittinghofer, A. (2008). The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3. *Nature structural & molecular biology*, 15(4), 373-80.
- Voloshin, O., Gocheva, Y., Gutnick, M., Movshovich, N., Bakhrat, A., Baranes-Bachar, K., Bar-Zvi, D., Parvari, R., Gheber, L., Raveh, D. (2010). Tubulin chaperone E binds microtubules and proteasomes and protects against misfolded protein stress. *Cellular and molecular life sciences*, 67(12), 2025-38.
- Wakida, N.M., Botvinick, E.L., Lin, J., Berns, M.W. (2010). An Intact Centrosome Is Required for the Maintenance of Polarization during Directional Cell Migration. *PLoS ONE*, 5(12), e15462.
- Wiese, C., Zheng, Y. (2006). Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *Journal of cell science*, 119, 4143-53.
- Yoon, J.H., Qiu, J., Cai, S., Chen, Y., Cheetham, M.E., Shen, B., Pfeifer, G.P. (2006). The retinitis pigmentosa-mutated RP2 protein exhibits exonuclease activity and translocates to the nucleus in response to DNA damage. *Experimental cell research*, 312(8), 1323-34.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*, 378(6557), 578-83.

VIII – Anexos

VIII.1 Mapas dos vectores de expressão

VIII.1.1 pIC111 (6xHis-PreScission-GFP) – vector construído no vector pcDNA3.1+ - vector de expressão em mamífero.

(Cheeseman & Desal, 2005)

```
GAGCTCTCTGGCTAAGTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAGCT
      ▲
      HindIII
NheI  PmeI  AfIII  KpnI          BamHI  SpeI  BstXI          EcoRI  PstI  EcoRV  BstXI
GGCTAGCGTTTAAACTTAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGATTCTGCAGATATCCAGCAC
  ▶ A F K L K L G T E L G S T S P V W W N S A D I Q H
      NotI  SacII
AGTGGCGGCGCGGgcagcagccca tea tea tea tea tcacagcagcggcc tggaggt tctgt tccaggggcccc tggaggt
▶ S G G R G S S H H H H H S S G L E V L F Q G P L E V
      BspEI
tctgttccaggggcccc TCCGGAGGGATGGTGAGCAGGGCGAGGAGCTGTTCCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC
▶ L F Q G P S G G M V S K G E E L F T G V V P I L V E
  TGGACGGCGACGTAARACGGCCACAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAGCTGACCCTG
▶ L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L
  AAGTTTCTATCGACCCACCGCAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTT
▶ K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F
  CAGCCGCTACCCCGACCCATGAGCAGCAGCAGCTTCTTCAGTCCGCCATGCCCGAGGGTACGTCACAGGAGCGCACCA
▶ S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T
  TCTTCTCAGGGACGCGGCAACTACAGACCCCGCGCGAGGTGAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCCGATCGAG
▶ I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E
  CTGAGGGGCGATCGACTTCAGGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAGCTGGAGTACAACACACAGCCACACGCTCTA
▶ L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y
  TATCATGGCCGACAGCAGAGACGGCAGTCAAGGTGAACTTCAGATCCGCCACACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC
▶ I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q
  TCGCCGACCACTACAGCAGACACCCCATCGGCAGCGGCCCGTGCTGCTGCCGACACCACTACCTGAGCAGCCAG
▶ L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q
  TCCGCCCTGAGCAAGACCCACAGAGAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCT
▶ S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L
      XbaI  ApaI  PmeI
CGGCATGGACGAGCTGTACAGTAACTAGAGGGGCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC
▶ G M D E L Y K ●
      AGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAGGTGCCACTCCCCTGTCTTCTAATAAAT
```

Laranja – 6xHis

Verde – PreScission “cleavage site” (2x)

Azul – eGFP

Seta – local de iniciação da transcrição

VIII.2 Organismos analisados no alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos da região N-terminal do TBCCD1

Quadro VIII.1. Organismos e respectivos números de acesso utilizados no alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos da região N-terminal do TBCCD1.

Organismo	Número de acesso
<i>Homo sapiens</i>	NP_001127887.1
<i>Pan troglodytes</i>	XP_516930.2
<i>Pongo abelii</i>	XP_002814429.1
<i>Nomascus leucogenys</i>	XP_003256654.1
<i>Bos taurus</i>	DAA33367.1
<i>Callithrix jacchus</i>	XP_002758258.1
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_545241.2
<i>Sus scrofa</i>	NP_001230398.1
<i>Macaca mulatta</i>	XP_001088550.2
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_002914865.1
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001012016.1
<i>Mus musculus</i>	NP_001074837.1
<i>Equus caballus</i>	XP_001499272.1
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	XP_002716505.1
<i>Monodelphis domestica</i>	XP_001366085.1
<i>Xenopus laevis</i>	NP_001121322.1
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	NP_001016961.2
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_001509227.1
<i>Gallus gallus</i>	NP_001006545.1
<i>Taeniopygia guttata</i>	XP_002196053.1
<i>Danio rerio</i>	NP_001083009.2
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAF95987.1
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	XP_002736825.1
<i>Crepidula fornicata</i>	ADG63460.1
<i>Schistosoma mansoni</i>	XP_002571361.1
<i>Branchiostoma floridae</i>	XP_002596599.1
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_001193557.1

<i>Nematostella vectensis</i>	XP_001622625.1
<i>Trichoplax adhaerens</i>	XP_002108524.1
<i>Schistosoma japonicum</i>	CAX73142.1
<i>Ciona intestinalis</i>	XP_002120383.1
<i>Oikopleura dioica</i>	CBY08565.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_567059.1
<i>Medicago truncatula</i>	ABN08645.1
<i>Picea sitchensis</i>	ABR16182.1
<i>Ricinus communis</i>	XP_002532335.1
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002331001.1
<i>Zea mays</i>	NP_001144767.1
<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002453473.1
<i>Vitis vinifera</i>	CBI30042.3
<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001778693.1
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	CBJ30275.1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ACJ03927.1
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	XP_001421339.1
<i>Micromonas pusilla</i>	XP_003060588.1
<i>Ostreococcus tauri</i>	XP_003083392.1
<i>Polysphondylium pallidum</i>	EFA79502.1
<i>Dictyostelium purpureum</i>	XP_003286328.1
<i>Monosiga brevicollis</i>	XP_001743179.1
<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001021610.1
